

**Isolation eines infektiösen RNA-A-Protein-Komplexes
aus dem Bakteriophagen M12
und seine biologische Bedeutung**

Barbara Leipold

1975

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
Martinsried bei München
Direktor : Prof.Dr. F. Lynen

Isolation eines infektiösen RNA-A-Protein-Komplexes
aus dem Bakteriophagen M12
und seine biologische Bedeutung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches 'Chemie und Pharmazie'
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt

von

Barbara Leipold

geb. Rimmelspacher

aus Dresden



1. Berichterstatter: Prof.Dr.Dr.P.H.Hofschneider

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann

Tag der Einreichung der Arbeit: 18.3.1975

Tag der Promotion : 27.5.1975

Herrn Prof. Dr. Hofschneider möchte ich herzlich danken für das der vorliegenden Arbeit entgegengebrachte Interesse und für die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Hartmann gilt mein besonderer Dank für die freundliche Übernahme des 2. Referates.

Verzeichnis der Abkürzungen

ANPO	2- [Naphthyl] - (1) -]-5-phenyloxazol
C	Celsius
cpm	meßbare Zerfälle pro Minute
D	Dalton
Dimethyl- POPOP	(1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-benzol
DNase	Desoxyribonuklease
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendinitrilotetraessigsäure (Dihydrat)
EM	Elektronenmikroskop
ET	experimenteller Teil
g	Gramm, Erdbeschleunigung
m	molar
M	Mol
mCi	Milli-Curie
MG	Molekulargewicht
PEG 6.000	Polyäthylenglykol vom MG 6.000 D
Phage	Bakteriophage
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S	Svedberg-Einheit (10^{-13} Sekunden)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
W	Gewicht

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	6
I. Isolation eines infektiösen RNA-A-Protein- komplexes aus den Phagen und Charakteri- sierung seiner Eigenschaften	6
a) Untersuchungen über die Dissoziation des Phagen M12 mit 66%iger Essigsäure	6
Diskussion	16
b) Lösungsversuche mit den Essigsäurenieder- schlägen	18
c) Infektiosität der gelösten Essigsäure- niederschläge gegenüber ganzen E.coli- Bakterien	21
d) Identifizierung eines infektiösen RNA- A-Proteinkomplexes in den gelösten Essig- säureniederschlägen im Saccharosegradien- ten	25
e) Bestimmung der Bindungsart zwischen der RNA und dem A-Protein im Komplex	42
f) Saccharosegradientenanalyse des gelösten Essigsäureniederschlages nach Dissoziation des RNA-A-Proteinkomplexes	50
g) Unabhängigkeit der Anzahl der isolierten Komplexmoleküle von verschiedenen Para- metern bei der Isolation	52
h) Untersuchungen über die Infektiosität des RNA-A-Proteinkomplexes gegenüber E.coli- Wirtszellen	57
1. Infektion der Bakterien mit dem Kom- plex via F-Pili	57
2. Penetration des RNA-A-Proteinkomplexes in die Bakterienzellen	62
3. Untersuchungen über Faktoren, welche die Infektiosität des RNA-A-Protein- komplexes beeinflussen	64
Diskussion	68

	Seite
II. Untersuchungen über das A-Protein des Phagen M12	79
a) Untersuchungen über den A-Proteingehalt des Phagen M12	79
b) Molekulargewichtsbestimmung des A-Proteins mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	86
Diskussion	89
III. Untersuchungen zum Infektiositätstiter von M12-Phagen	93
a) Isolation des RNA-A-Proteinkomplexes aus unterschiedlich infektiösen Phagen	93
Diskussion	99
Experimenteller Teil	103
A. Material	103
B. Methoden	109
1) Gewinnung und Anreicherung von unmarkierten und radioaktiv markierten M12-Phagen	109
a) Herstellung unmarkierter Phagen	109
b) Herstellung von radioaktiv markierten Phagen	112
I) ^{32}P -markierte Phagen	112
II) ^{35}S -markierte Phagen	112
III) ^3H -Histidin-markierte Phagen	113
2) UV-spektroskopische Messungen	114
3) Präparation der SDS-Acrylamid-Diacrylatgele	114
4) Isolierung von Essigsäureniederschlägen aus den Phagen	115
5) Isolation der Phagenproteine mit Phenol aus den Phagen und Vorbereitung für die Gel-elektrophorese	116
6) Isolation der Phagenproteine mit Phenol aus einem Essigsäureniederschlag	117

	Seite
7) Auftrennung radioaktiv markierter Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	117
8) Isolation der RNA mit Phenol aus den Phagen	118
9) Isolation der RNA mit Phenol aus einem Essigsäureniederschlag	119
10) Bestimmung des biologischen Phagentiters im Plaquetest	119
11) Bestimmung der Infektiosität in gelösten Essigsäureniederschlägen mit dem Infektiositätstest	120
12) Herstellen der Sphäroplasten	120
13) Bestimmung der infektiösen RNA im Sphäroplastentest	121
14) Abscheren der F-Pili von den E.coli-Bakterien AB301 mit dem Ultrathorax	121
15) Analyse der gelösten Essigsäureniederschläge im Saccharosegradienten	122
I. Herstellung der Gradienten	122
II. Analyse der Gradientenfraktionen auf	
a. Infektiosität	122
b. RNA	123
c. ^{35}S -Radioaktivität des A- und Coatproteins	123
d. ^3H -Histidin-Radioaktivität des A-Proteins	123
e. Proteingebundene, radioaktiv markierte ^{32}P -RNA mit dem Nirenberg-Filtertest	124
16) Analyse der mit ^{35}S radioaktiv markierten Proteine, die im Saccharosegradienten unter dem Infektiositätsgipfel bandieren, mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese	124
17) Bestimmung der proteingebundenen, mit ^{32}P -markierten RNA in den gelösten Essigsäureniederschlägen mit Hilfe des Nirenberg-Filtertestes	125
18) Isolierung von Coatprotein aus den Phagen mit 66%iger Essigsäure	125

	Seite
19) Herstellung der Acrylamid-Methylenbisacrylamidgele	126
20) Molekulargewichtsbestimmung des A- und Coatproteins mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese	126
a) Herstellen der A-/Coatproteinlösung	126
b) Herstellung der Eichproteinlösungen	127
c) Durchführung der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung	127
d) Auswertung der Experimente und Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeiten der Proteine	128
Zusammenfassung	130
Literaturverzeichnis	133

Einleitung

1961 wurde von Loeb und Zinder der E.coli-Phage f2 entdeckt, der im Unterschied zu allen bisher bekannten Phagen als genetisches Material RNA anstelle von DNA enthielt. In der darauffolgenden Zeit wurden weitere derartige Phagen beschrieben, die in ihren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften dem Phagen f2 sehr ähnlich waren. Alle diese Phagen wurden in der f2-Gruppe zusammengefaßt.

Zu dieser Gruppe gehört auch der RNA-Phage M12, der 1963 von Hofschneider isoliert wurde und an dem die hier beschriebenen Untersuchungen durchgeführt wurden.

Die RNA-Phagen der f2-Gruppe können ausschließlich E.coli-F⁺- oder Hfr-Bakterienstämme infizieren, da nur diese Stämme an ihrer Oberfläche F-Pili besitzen, welche die Phagen zur Infektion benötigen. Sie bestehen aus einem Molekül einzelsträngiger, linearer RNA, 180 Molekülen Coatprotein und einem Molekül A-Protein.

Die RNA der Phagen, die mit einem Molekulargewicht von ca. 10^6 D zu den kleinsten bekannten Virusnukleinsäuren zählt, enthält drei Cistren, welche die drei phagenspezifischen Proteine, nämlich das Coatprotein, das A-Protein und eine Untereinheit der Replicase codieren. Die Replicase wird vom C-Cistron codiert (Gussin, 1966) und ist kein Strukturprotein der Phagen. Sie wird erst nach erfolgter Phageninfektion in den Wirtszellen synthetisiert und repliziert dort die Phagen-RNA, wobei diese sowohl als Templat bei der Replikation als auch als polycistronischer Messenger bei der Translation dient. Das Coatprotein der Phagen wird vom B-Cistron (Capechi u. Gussin, 1965) codiert und erfüllt mehrere Funktionen. So umkleidet es einmal die RNA der Phagen und schützt sie damit vor nucleolytischen Agenzien.

Zum zweiten kontrolliert es die Synthese der viralen Replicaseuntereinheit. Dies konnte durch in vivo als auch durch in vitro-Versuche gezeigt werden (Sugiyama u. Nakada, 1967 und 1968, Eggen u. Nathans, 1969, Lodish, 1969, Nathans et al., 1969).

Drittens scheint es eine Rolle bei der Lyse infizierter Wirtszellen zu spielen (Zinder u. Lyons, 1968).

Eine wichtige Rolle im Lebenszyklus der RNA-Phagen spielt das vom A-Cistron codierte A-Protein, obwohl nur 1 Molekül dieses Proteins im Phagen vorkommt. Welche Funktionen es erfüllt, wurde mit Phagenmutanten untersucht, die eine conditional lethale Mutation im A-Cistron besaßen.

Werden nicht permissive Bakterien mit solchen Mutanten infiziert, so entstehen Phagen, die sich von Wildtypphagen nur dadurch unterscheiden, daß sie anstelle des A-Proteinmoleküles nur ein A-Proteinmolekülfragment oder gar kein A-Protein enthalten. Diese Phagen werden defekte Partikel genannt, da sie nicht infektiös sind und nicht an ihre Wirtsbakterien adsorbieren können (Horiuchi, Lodish u. Zinder, 1966). Von Wildtypphagen können sie im EM nicht unterschieden werden. Sie unterscheiden sich jedoch in anderen Hinsichten von ihnen. Obwohl sie nicht infektiös sind, enthalten sie intakte infektiöse RNA, die aber teilweise durch RNase verdaubar ist. Im Vergleich dazu ist die RNA im Wildtypphagen RNase-resistent. Die Sedimentationskonstante der defekten Partikel beträgt 69 S, die der Wildtypphagen 79 S. Die niedrigere Sedimentationskonstante der defekten Partikel kann dadurch erklärt werden, daß ein Teil der RNA aus der Proteinhülle herausragt. Wird dieser RNA-Anteil mit RNase abgedaut, werden sogenannte "leichte" defekte Partikel erhalten. Diese enthalten nur noch ein 70% Fragment der RNA, das das intakte 3'-Ende besitzt (Lodish, 1968a u. b). Daraus wurde geschlossen, daß das 5'-ppp-Ende

der RNA aus der Proteinhülle der defekten Partikel herausragt und dadurch mit RNase verdaut werden kann.

1970 erhielt Kaerner ebenfalls defekte Partikel; er benutzte den Umstand, daß die Aminosäure Histidin im A-Protein aber nicht im Coatprotein vorkommt, und verhinderte die A-Proteinsynthese in mit Wildtypphagen infizierten Zellen durch Histidinhunger. Dabei beobachtete er defekte Partikel. Erlaubte er die A-Proteinsynthese wieder, nachdem sich die defekten Partikel gebildet hatten, so bauten diese nachträglich kein A-Protein mehr ein.

Nach diesen Ergebnissen wurde angenommen, daß das A-Protein für die Reifung der RNA-Phagen verantwortlich ist, indem es schon zu frühen Zeiten in der Phagenentwicklung mit der RNA assoziiert und dieser dadurch eine Struktur derart verleiht, daß sie in richtiger Weise vom Coatprotein umhüllt werden kann, bis ein kompletter Phage entstanden ist. Deshalb wird das A-Protein auch Reifungsprotein genannt.

Richelson und Nathans (1967) studierten die Wechselwirkung zwischen der RNA und den phagenspezifischen Proteinen bei der in vivo-Phagenreifung von MS2. Dabei fanden sie in den infizierten Zellen Komplexe aus phagenspezifischer RNA, Replicase, A- und Coatprotein, bei denen das Molekülverhältnis zwischen A- und Coatprotein viel größer war als im ganzen Phagen, wo es 1:180 beträgt. Sie folgerten daraus, daß das A-Protein bereits zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb der Phagenreifung an die RNA assoziiert wird, zu dem erst wenige Coatproteinmoleküle um die RNA angeordnet sind.

Zu prinzipiell gleichen Ergebnissen gelangten Cramer und Sinsheimer 1971, als sie während der in vivo-Phagenreifung Komplexe aus virusspezifischer RNA, Coat- und A-Protein als Vorläufer der reifen Phagen entdeckten.

Auf Grund dieser Befunde erhebt sich die Frage nach der Existenz und der biologischen Funktion eines RNA-A-Pro-

teinkomplexes in den reifen Phagen. Wenn ein solcher Komplex vorläge, sollte er unter geeigneten Bedingungen aus den Phagen zu isolieren sein.

Der erste Teil dieser Arbeit wird sich mit dieser Frage beschäftigen und die Versuche zur Isolation eines solchen Komplexes aus gereinigten M12-Phagen und seine Eigenschaften beschreiben.

Bei der Infektion von E.coli-Bakterien mit RNA-Phagen ist es das A-Protein, das die Adsorption der Phagen an die F-Pili der Zellen ermöglicht. Deshalb wird das A-Protein auch als Adsorptionsprotein der Phagen bezeichnet.

Nach den Untersuchungen von Argetsinger-Steitz (1968 a u. b) am RNA-Phagen R 17 wird allgemein in der Literatur 1 Molekül A-Protein pro RNA-Phage angenommen. Demzufolge sollte jeder Phage in einer Lösung an seine Wirtsbakterien adsorbieren können. Versuche von Paranchych und Mitarb. (1970) zeigten jedoch, daß nur ca. 50% der Phagen in einer Lösung an ihre Wirtszellen adsorbieren. Dieser Befund und der an verschiedenen M12-Präparationen beobachtete unterschiedliche A-Proteingehalt führte zu der Fragestellung nach der Zahl der A-Proteinmoleküle im Phagen M12. Die Versuche dazu werden im zweiten Teil der Arbeit beschrieben.

Wird eine RNA-Phagenlösung mit physikalischen Methoden analysiert, so stellt sie sich als homogene Phagenpopulation dar. In den biologischen Eigenschaften der Phagen sind jedoch Unterschiede festzustellen. So ist stets nur ein kleiner Teil der physikalisch vorhandenen Phagen infektiös, der seine RNA in die Zellen injiziert, während die Coatproteinhülle außerhalb der Zellen verbleibt (Edgell u. Ginoza, 1965, Silverman u. Valentine, 1969, Paranchych u. Mitarb. 1970 u. 1971).

Eine bisher ungeklärte Frage ist, was die infektiösen Phagen von den nichtinfektiösen unterscheidet. Es ist bekannt, daß das A-Protein für die Infektiosität der RNA-Phagen erforderlich ist. Dies ergab sich einmal aus genetischen Studien. So waren Phagen, die nach Infektion von nicht permissiven Wirtszellen mit A-Cistronambermutanten gebildet worden waren, nicht infektiös, obwohl sie infektiöse RNA enthielten.

Zum zweiten zeigten in vitro-Rekonstitutionen von RNA-Phagen, daß außer der RNA und dem Coatprotein A-Protein in den Ansätzen vorhanden sein mußte, um infektiöse Phagen zu erhalten.

Nach all diesen Daten sind Phagen nur dann infektiös, wenn sie A-Protein enthalten. Die Gegenwart des A-Proteins allein erklärt jedoch nicht die geringen Infektiositätstiter der Phagen, da nach Argetsinger-Steitz (1968 b) ca. jeder Phage ein Molekül A-Protein enthält, aber nur jeder 20.-10. Phage einer Phagenlösung infektiös ist.

Der dritte Teil der Arbeit berichtet von Untersuchungen, die die Frage klären sollten, was die Phagen infektiös macht und wodurch die niedrigen Infektiositätstiter der RNA-Phagen verursacht sind.

I. Isolation eines infektiösen RNA-A-Proteinkomplexes aus den Phagen und Charakterisierung seiner Eigenschaften

a) Untersuchungen über die Dissoziation des Phagen M12 mit 66%iger Essigsäure

Zur Isolierung eines RNA-A-Proteinkomplexes aus dem Phagen M12 mußte nach einer Methode gesucht werden, die erstens effizient das Coatprotein von der RNA und dem A-Protein abtrennt und zweitens einen in dem Phagen vorhandenen RNA-A-Proteinkomplex nicht zerstört.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Dissoziation von RNA-Phagen mit hochmolaren Harnstoff- bzw. Guanidinhydrochloridlösungen trennen die Phagen in ihre drei Komponenten RNA, A- und Coatprotein und waren daher ungeeignet zur Isolierung eines RNA-A-Proteinkomplexes aus den Phagen.

Eine andere Möglichkeit der Virusdissoziation zeigte Fraenkel-Conrat 1957 auf. Er behandelte das Tabakmosaikvirus, ein RNA-Pflanzenvirus, das im Gegensatz zu den RNA-Phagen nur aus zwei Komponenten, nämlich der RNA und dem Coatprotein besteht, in der Kälte mit 66%iger Essigsäure. Dabei fällt die RNA aus und kann leicht von dem Coatprotein, das im Überstand verbleibt, abzentrifugiert werden. Diese Methode gestattete also in einfacher Weise die Virusdissoziation in RNA und Coatprotein. Sie wurde 1967 von Sugiyama und Mitarbeitern und von Hohn in modifizierter Form erfolgreich zur Coatproteinisolierung aus den RNA-Phagen MS2 und f2 benutzt. Dabei erhielten die Autoren ebenfalls die RNA im Niederschlag und das Coatprotein im Überstand.

Damals wurde dabei die Frage nicht berührt, ob das A-Protein der Phagen gemeinsam mit dem Coatprotein in den Überstand oder mit der RNA in den Niederschlag gelangte, da das A-Protein erst 1968 von Argetsinger-Steitz (1968 a) und von

Viñuela u. Mitarb. als Strukturprotein von RNA-Phagen identifiziert wurde.

Es wurde daher als erstes untersucht, ob durch die Essigsäuremethode der Phage M12 in einen Niederschlag, der die RNA und das A-Protein enthält, und in einen Coatproteinüberstand dissoziiert werden konnte. Wenn dies zuträfe, wäre diese Methode geeignet, um die erste Voraussetzung zur Isolierung eines RNA-A-Proteinkomplexes zu erfüllen, nämlich die Abtrennung des Coatproteins von der RNA und dem A-Protein der Phagen.

Um den Weg des A-Proteins bei der Essigsäurebehandlung der Phagen verfolgen zu können, wurde dieses radioaktiv markiert. 1968 a hatte Argetsinger-Steitz beschrieben, daß das A-Protein des RNA-Phagen R17 selektiv mit radioaktivem Histidin markiert werden konnte, weil diese Aminosäure im A-Protein (Nathans u. Mitarb., 1966, Viñuela u. Mitarb., 1967) aber nicht im Coatprotein der Phagen vorkam (Enger u. Kaesberg, 1965, Weber, 1967). Es war zu vermuten, daß dies auch für den verwandten Phagen M12 galt. Um dies zu überprüfen, wurden M12-Phagen mit ^3H -Histidin markiert (s. ET, S.113). Die Proteine wurden mit Phenol aus den Phagen extrahiert und auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (s. ET, S.116,117).

Abb. 1 zeigt das Ergebnis: fast die gesamte ^3H -Histidin-radioaktivität bandiert in der Position des A-Proteins der Phagen (Fraktion 32), während nur ein geringer Markierungsanteil in Fraktion 51 zu finden ist (Coatprotein bandiert in Fraktion 55), der kaum aus dem Background herausragt.

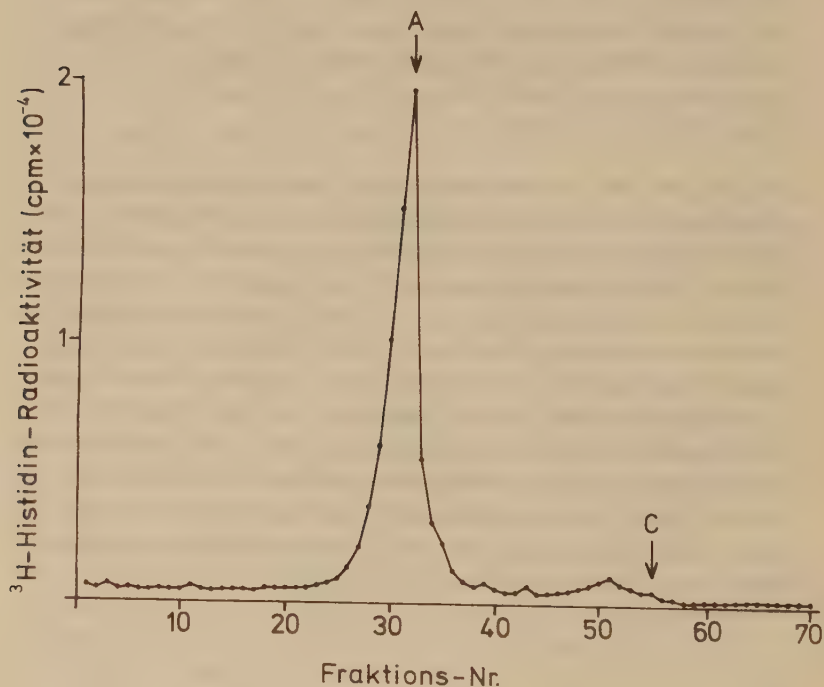


Abb. 1: Radioaktivitätsprofil ^3H -Histidin-markierter Proteine, die mit Phenol aus den M12-Phagen isoliert wurden, nach Auftrennung im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wanderten von der Kathode zur Anode (von links nach rechts). Die Pfeile geben die üblichen Positionen des A- und Coatproteins an.

Damit war gezeigt, daß auch im Phagen M12 das A-Protein selektiv mit radioaktivem Histidin markiert werden kann, da diese Aminosäure nur im A-Protein aber nicht nachweisbar im Coatprotein vorkommt.

Nachdem die selektive A-Proteinmarkierung mit ^3H -Histidin sichergestellt war, wurden 0,5ml einer so markierten Phagenlösung (1,5 mg M12/ml) für eine Stunde mit dem doppelten Volumen an Eisessig in der Kälte gefällt (s.ET, S.115). Der entstandene Essigsäureniederschlag wurde abzentrifugiert und nach dem Abpipettieren des Überstandes gewaschen und getrocknet und in STE-Puffer mit 1% SDS gelöst. Aliquots des gelösten Niederschlages und des Überstandes wurden mit 5%iger TCA gefällt, um die Verteilung des A-Proteins zwischen Niederschlag und Überstand anhand der ^3H -Histidinradioaktivität festzustellen. Dabei wurden in allen untersuchten Fällen stets 97-98% der Histidinradioaktivität der zur Essigsäurefällung eingesetzten Phagen in den Essigsäureniederschlägen gefunden und 2-3% in den Überständen. Alle Prozeduren sind im experimentellen Teil beschrieben.

Wurden aus dem gelösten Essigsäureniederschlag mit Phenol die Proteine isoliert (s.ET, S.117) und im SDS-Polyacrylamidgel analysiert, so fand sich die gesamte Histidinradioaktivität in der Position des A-Proteins, s. Abb. 2.

Die Verteilung der Phagen-RNA auf Niederschlag und Überstand nach Essigsäurebehandlung der Phagen wurde mit Phagen ermittelt, deren RNA mit ^{32}P markiert war. Dabei fanden sich mehr als 99% der in den Phagen vorhandenen Radioaktivität im Niederschlag und weniger als 1% im Überstand. Durch die Essigsäurefällung der Phagen gelangt also auch fast die gesamte RNA der Phagen in den Niederschlag.

Als nächstes wurde untersucht, ob das Coatprotein der Phagen durch die Essigsäurebehandlung der Phagen quantitativ von der

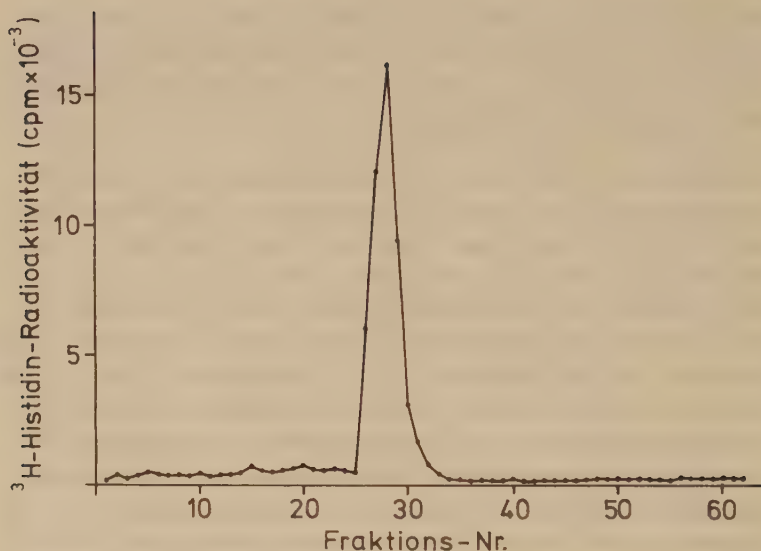


Abb. 2: Radioaktivitätsprofil ^3H -Histidin-markierter Proteine, die nach einstündiger Essigsäurefällung der Phagen durch Phenolisieren aus dem Essigsäureniederschlag erhalten wurden, nach Auftrennen im SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wanderten anodisch (von links nach rechts).

RNA und dem A-Protein abgetrennt wurde oder ob ein Teil des Coatproteins gemeinsam mit der RNA und dem A-Protein in den Essigsäureniederschlag präzipitiert. Da eine selektive radioaktive Markierung des Coatproteins nicht möglich ist - alle Aminosäuren des Coatproteins kommen auch im A-Protein vor - wurden für die Experimente M12-Phagen verwendet, in denen das A- und das Coatprotein mit ^{35}S markiert waren.

Aus diesen Phagen wurde der Essigsäureniederschlag isoliert, indem 0,5 ml der Phagenlösung (1,5 mg M12/ml) mit dem doppelten Volumen Eisessig bei 0°C für eine Stunde gefällt wurden. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Über-

stand abpipettiert. Nach dem Waschen und Trocknen wurde der Niederschlag in STE-Puffer mit 1 % SDS gelöst. Die TCA-fällbare ^{35}S -Radioaktivität der Proteine im Überstand und im Essigsäureniederschlag wurde jeweils gemessen wie bei der ^3H -Histidinprobe.

Dabei fanden sich ca. 98 % der Radioaktivität im Überstand und ca. 2 % im Niederschlag. Zur Ermittlung der Proteinzusammensetzung wurden aus dem Niederschlag die Proteine mit Phenol isoliert und im SDS-Polyacrylamidgel getrennt (s.ET, S.116,117). Das Ergebnis ist in Abb. 3 dargestellt.

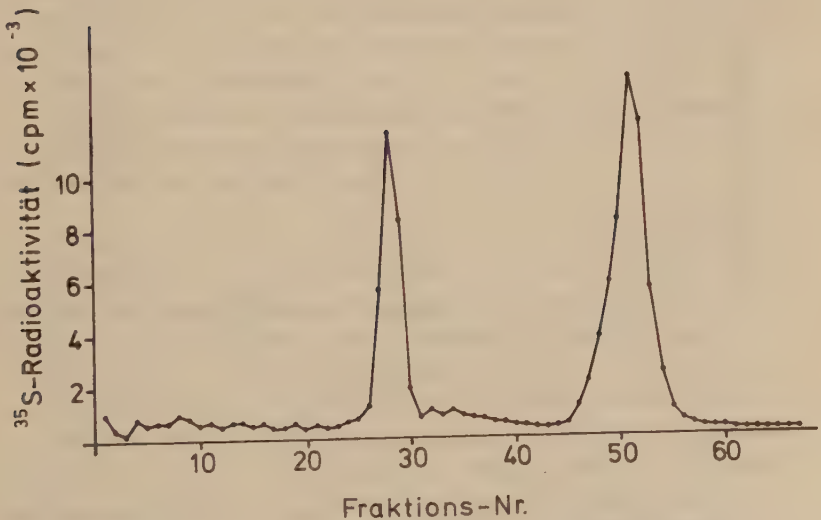


Abb. 3: Radioaktivitätsprofil ^{35}S -markierter, phenolextrahierter Proteine aus dem Essigsäureniederschlag nach einstündiger Fällung nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wanderten anodisch (von links nach rechts).

Auf dem Gel fanden sich zwei Proteingipfel in den Positionen des A- und Coatproteins wie der Vergleich mit dem Proteinprofil eines Gels zeigte, in dem mit Phenol aus den Phagen extrahierten Proteine parallel analysiert wurden (s. Abb. 4).

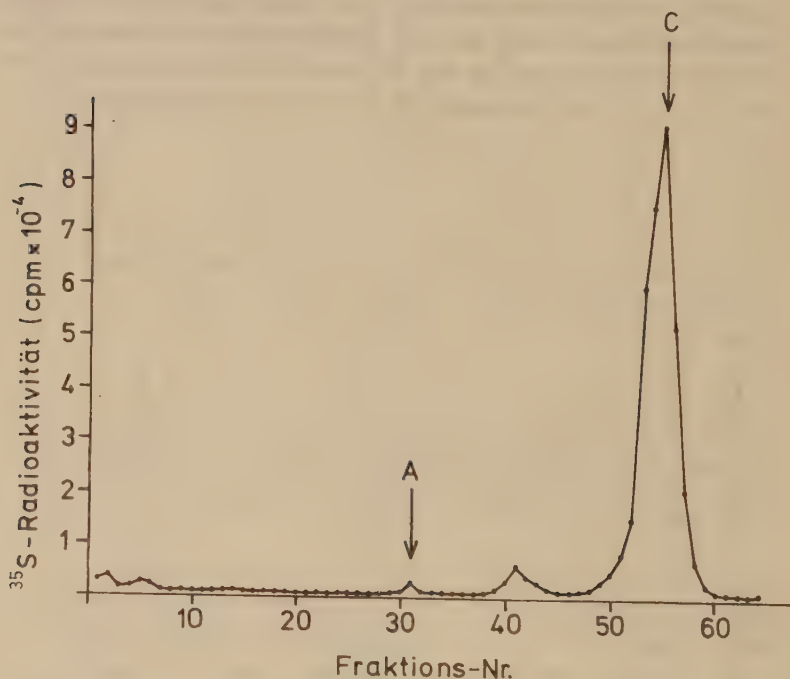


Abb. 4: Radioaktivitätsprofil ^{35}S -markierter, phenolextrahierter Proteine aus den Phagen nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wanderten anodisch (von links nach rechts). Die Pfeile bezeichnen die Positionen des A- und Coatproteins.

Die beiden Proteingipfel in Abb. 3 demonstrieren, daß außer dem A-Protein auch ein geringer Anteil des Coatproteins der Phagen in den Essigsäureniederschlag gelangt. Die im Niederschlag vorhandenen 2% der gesamten ^{35}S -Radioaktivität der Phagen setzten sich also zusammen aus der im A- und im Coatprotein vorliegenden Markierung, wobei sich der Coatproteinanteil aus dem Markierungsverhältnis der Proteine im Gel in Abb. 3 kalkulieren ließ. Das Verhältnis aus der unter dem A- und Coatproteingipfel bandierenden Radioaktivität errechnete sich 1:1,7 für den Essigsäureniederschlag, während es für die aus den ganzen Phagen isolierten Proteine in Abb. 4 1:135 beträgt.

Aus diesem Verhältnis ergibt sich, daß ca. 60% der Radioaktivität des Essigsäureniederschlages vom Coatprotein stammen. Diese entsprechen 1,2% der gesamten Markierung und damit des Coatproteins im Phagen, da fast die gesamte ^{35}S -Markierung der Phagen im Coatprotein liegt (in Abb. 4 ca. 98%). D.h., etwa 1,2% des Coatproteins der Phagen präzipitieren bei der einstündigen Essigsäurebehandlung mit dem A-Protein und der RNA in den Essigsäureniederschlag.

Bei allen Essigsäurefällungen erschienen die Niederschläge immer unmittelbar nach dem Mischen der Phagenlösungen mit der Essigsäure. Deshalb war zu vermuten, daß die Dissoziation der Phagen sofort nach Essigsäurezugabe erfolgte. Es schien daher sinnvoll, die Essigsäurebehandlung der Phagen zu verkürzen, wenn dabei eine ebenso effiziente Dissoziation erreicht werden konnte wie bei einer einstündigen Behandlung. Die mit ^{35}S -markierten Phagen wurden zu diesem Zwecke anstatt für eine Stunde nur für 5 Minuten bei 0°C mit 66%iger Essigsäure behandelt. Danach fanden sich im Essigsäureniederschlag 1,2% der gesamten Radioaktivität der Phagen und im Überstand 98,7%. Die Analyse der Proteine des Essigsäureniederschlages im SDS-Polyacrylamidgel (s. Abb. 5) ergab ein Markierungsverhältnis zwischen A- und Coatprotein von 1,4:1. Daraus errechnete sich für das

Coatprotein ein Anteil von 42% von der gesamten im Essigsäureniederschlag vorhandenen Radioaktivität, der 0,5% der gesamten im Coatprotein der Phagen vorliegenden Markierung entspricht.

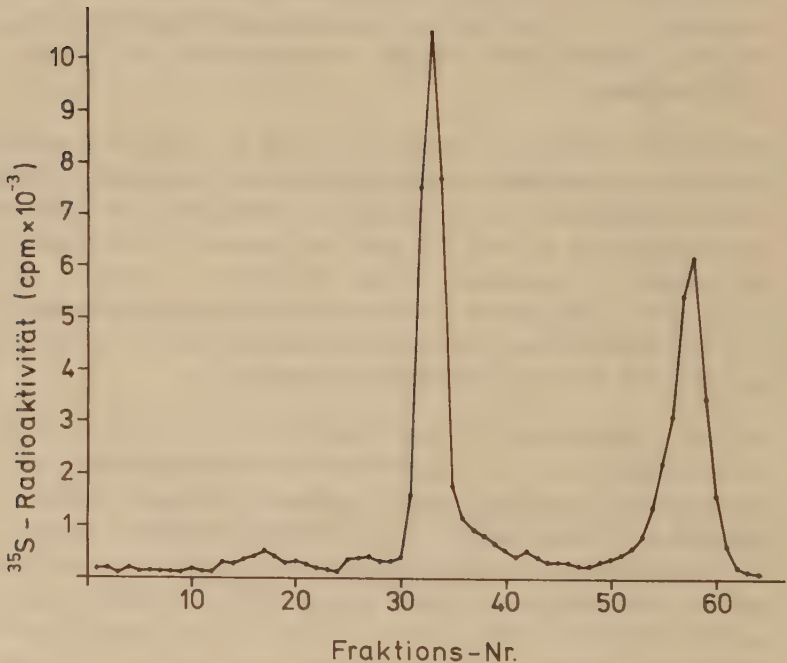


Abb. 5: Radioaktivitätsprofil ^{35}S -markierter Proteine, die nach fünfminütiger Essigsäurefällung der Phagen durch Phenolisieren aus dem Essigsäureniederschlag erhalten wurden, nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wanderten von der Kathode zur Anode (von links nach rechts).

Die ermittelte Proteinzusammensetzung der Essigsäureniederschläge änderte sich nicht, wenn die Phagenkonzentration bei der Essigsäurebehandlung zwischen 3,5 - 0,6 mg M12/ml variierte. Wurde die fünfminütige Essigsäurebehandlung bei mit ^3H -Histidin- bzw. ^{32}P -markierten Phagen angewendet, so zeigten sich wie bei der einstündigen Fällung ca. 98% der ^3H -Histidin- und mehr als 99% der ^{32}P -Radioaktivität der Phagen im Essigsäureniederschlag.

Durch die Verkürzung der Essigsäurebehandlung der Phagen von 1 Stunde auf 5 Minuten sinkt also der Coatproteinanteil im Essigsäureniederschlag von 1,2 auf 0,5% des gesamten Coatproteins der Phagen, während die Werte für das A-Protein und die RNA unverändert bleiben.

Nach diesen Ergebnissen sollte es möglich sein, durch eine zweite Essigsäurebehandlung den Coatproteingehalt des Essigsäureniederschlages auf 0,5% zu reduzieren, wenn diese ebenso effizient wäre wie die erste. Dann sollten noch ca. 0,0025% des gesamten Coatproteins der Phagen im Niederschlag vorhanden sein. Die mit ^{35}S -markierten Phagen wurden daher mit 66%iger Essigsäure für 5 Minuten bei 0°C behandelt und ebenso der ausgefallene Essigsäureniederschlag nach Lösen in STE-Puffer mit 1% SDS. Bei der Analyse der Proteine dieses Niederschlages im SDS-Polyacrylamidgel resultierte ein Markierungsverhältnis zwischen A- und Coatprotein von 2,6:1 bei einer Gesamtradioaktivität von ca. 1% der Phagenmarkierung. Daraus wurde rechnerisch ermittelt, daß noch 0,25% des gesamten Phagencoatproteins anstatt der erwarteten 0,0025% in dem Essigsäureniederschlag nach zweimaliger Fällung vorliegen.

Diskussion

Die Methode der Behandlung von RNA-Phagen mit 66%iger Essigsäure für eine Stunde in der Kälte, die von Sugiyama und Mitarb. (1967) u. Hohn (1967) zur Coatproteinisolierung aus den Phagen MS2 und f2 verwendet wurde, wurde hier auf den Phagen M12 übertragen mit der Fragestellung, ob durch ihre Anwendung das Coatprotein von der RNA und dem A-Protein getrennt wird.

Es wurde dabei gezeigt, daß bei Anwendung dieser Methode die RNA des Phagen M12 präzipitiert und sich zu mehr als 99% nach dem Abzentrifugieren im Niederschlag wiederfindet. Ebenso liegt das A-Protein der Phagen nahezu quantitativ im Essigsäureniederschlag vor.

Ca. 99% des Coatproteins der Phagen werden bei der Essigsäurebehandlung von der RNA und dem A-Protein abgetrennt und finden sich im Überstand, während etwa 1% im Essigsäureniederschlag vorkommt. Da das Coatprotein in 66%iger Essigsäure löslich ist, ist zu vermuten, daß dieser geringe Coatproteinanteil durch die präzipitierende RNA bei der Essigsäurefällung mit in den Niederschlag gerissen wird.

Durch eine Verkürzung der Essigsäurebehandlung der Phagen von einer Stunde auf fünf Minuten wurde eine noch effizientere Coatproteinabtrennung erreicht. Hierbei finden sich nur noch 0,5% des Coatproteins der Phagen im Essigsäureniederschlag neben einer unveränderten Menge an RNA und A-Protein. Durch eine zweite Essigsäurefällung wurde der Coatproteinanteil im Essigsäureniederschlag weiter verringert auf 0,25%. Davon ausgehend, daß bei der zweiten Essigsäurefällung mit gleicher Effizienz wie bei der ersten ca. 99,5% des Coatproteins der Phagen von der RNA und dem A-Protein abgetrennt werden, waren nach der zweiten Fällung jedoch nur noch 0,0025% des Coatproteins im Essigsäure-

niederschlag erwartet worden. Daß dies nicht gefunden wurde, ist schwer zu interpretieren. Möglicherweise liegt das Coatprotein des Essigsäureniederschlages nach dem Lösen in Puffer zum Teil in Aggregaten vor, die bei der zweiten Essigsäurefällung präzipitieren.

1970 wurde von Osborn und Mitarb. berichtet, daß das Coatprotein des RNA-Phagen R17 quantitativ durch eine einstündige Behandlung der Phagen mit 66%iger Essigsäure bei 0°C von der RNA und dem A-Protein abgetrennt werden kann.

Für den Phagen M12 konnte dieses Ergebnis in keinem Falle erhalten werden. Man muß daher annehmen, daß sich die Coatproteine der beiden verwandten Phagen unterschiedlich verhalten bei der Essigsäurebehandlung der Phagen.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Unter den getesteten Bedingungen ist der Phage M12 am wirkungsvollsten durch eine fünfminütige Behandlung mit 66%iger Essigsäure bei 0°C zu dissoziieren. Dabei präzipitieren die RNA und das A-Protein in den Essigsäureniederschlag, während das Coatprotein zu ca. 99,5% abgetrennt, sich im Überstand befindet. Diese Methode wurde daher für alle weiteren Isolierungen von Essigsäureniederschlägen angewandt, da sie die eingangs gestellte Erwartung einer effizienten Coatproteinabtrennung von der RNA und dem A-Protein der Phagen erfüllte.

Der Grund für das gemeinsame Ausfallen von RNA und A-Protein bei der Essigsäurebehandlung der Phagen könnte einmal in der Unlöslichkeit des A-Proteins, zum anderen in der Bindung des A-Proteins an die RNA liegen. Es wurde vermutet, daß letzteres zutreffend war. Daher schien die weitere Analyse der Essigsäureniederschläge für die Entscheidung der Frage nach einem RNA-A-Proteinkomplex in den Phagen geeignet zu sein.

b) Lösungsversuche mit den Essigsäureniederschlägen

Zur Identifizierung eines RNA-A-Proteinkomplexes in den Essigsäureniederschlägen war es erforderlich, ein Lösungsmittel für die Niederschläge zu finden, das die RNA-A-Protein-Komplexbindung nicht dissoziierte.

Dabei konnte davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei wie bei den meisten Nukleinsäure-Proteinkomplexen um eine nicht kovalente RNA-Proteinbindung handelte.

Nach Osborn und Mitarb. (1970) war der Essigsäureniederschlag des RNA-Phagen R17 nur in SDS-haltigen Puffern wieder aufzulösen. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis waren die Essigsäureniederschläge aus dem Phagen M12 für die im vorherigen Kapitel beschriebenen Experimente in einem SDS-haltigen Puffer ohne Schwierigkeiten gelöst worden.

Ein solches Lösungsmittel konnte jedoch hier nicht verwendet werden, weil SDS nicht kovalente Nukleinsäure-Proteinbindungen dissoziiert.

Das Auflösen der Niederschläge in wäßrigen Puffern ohne SDS erwies sich als außerordentlich schwierig. So waren die Niederschläge in anfänglich benutzten Puffern, die 0,01 m Mg^{2+} -Ionen u.a. enthielten, unlöslich. Es mußte daher eine große Anzahl von Puffern ohne SDS getestet werden, bis ein geeignetes Lösungsmittel für die Essigsäureniederschläge gefunden wurde.

Für die Lösungsversuche wurden Essigsäureniederschläge verwendet (s.ET, S.115), deren RNA mit ^{32}P markiert war. Der Anteil der gelösten RNA war dabei das Maß für das Lösen der Niederschläge. Zu den gewaschenen und getrockneten Niederschlägen (s.ET, S.115) wurden jeweils 0,25 ml eines Puffers als Lösungsmittel gegeben. Zum besseren Lösen wurde für 5 Minuten bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Danach wurde von ungelösten

Anteilen niedertourig abzentrifugiert (3.100xg). Die ^{32}P -Radioaktivität der Überstände und der Niederschläge - letztere wurden in STE-Puffer+1% SDS gelöst - wurde durch Aus-tropfen auf Papierfiltern gemessen. Dabei wurde die Summe der Radioaktivität aus Überstand und Niederschlag gleich 100 % gesetzt. Die für die Lösungsversuche verwendeten Puffer und die jeweils gelösten RNA-Anteile in Prozent der gesamten Phagen-RNA sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Daraus ist ersichtlich, daß teilweises Lösen in Puffern gelang, in denen die Mg^{2+} -Ionen durch Na^{+} -Ionen substituiert waren. In einem Puffer, der 0,01m Tris und 0,001m EDTA enthielt, konnten ca. 90% der RNA aus den Niederschlägen gelöst werden. Eine Steigerung der EDTA-Konzentration des Puffers erhöhte die Löslichkeit. Schließlich lösten sich in einem Puffer, der 0,01 m Tris und 0,02 m EDTA enthielt, ca. 98% der RNA. Dieser Puffer wurde Puffer II genannt. In diesem Puffer sind auch mehr als 95% des A-Proteins löslich, wie mit ^3H -Histidin-markiertem A-Protein gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz zu den Resultaten von Osborn u. Mitarb. (1970) ist somit demonstriert, daß der Essigsäureniederschlag auch ohne SDS-Zugabe aufgelöst werden kann, sofern nur die richtigen Ionenbedingungen eingestellt werden.

Puffer II wurde für die weitere Analyse der Essigsäureniederschläge als Lösungspuffer benutzt.

Tabelle 1

Lösungspuffer für die Niederschläge gelöste RNA (in % der Gesamt-RNA)

0,05 m Tris, 0,01 m Mg-Acetat, 0,06mKCL, ph 7,0	2
" "	1
" "	1
" "	2
" 0,01 m NaCl, ph 7,8	45
0,01 m Tris, 0,05 m NaCl, ph 7,0	59
" 0,01 m Mg-Acetat, 0,06mKCL, ph 7,4	2
" "	8
" 0,01 m Na-Acetat, " "	63
0,01 m Tris, 0,05 m NaCl, 10^{-3} m EDTA, ph 7,0	63
" " 4 x 10^{-3} m EDTA	83
" , 10^{-3} m EDTA ph 7,4	88
" 5 x 10^{-3} m EDTA	94
" 10^{-2} m EDTA	96
" 2 x 10^{-2} m EDTA	98
" "	98
" + 1% Mercapto- Äthanol	

Lösungsversuche mit den Essigsäureniederschlägen des Phagen M12 in Puffern verschiedener Zusammensetzung.

c) Infektiosität der gelösten Essigsäureniederschläge gegenüber ganzen E.coli-Bakterien

In Puffer II gelöste Essigsäureniederschläge wurden mit dem Plaquetest darauf untersucht, ob sie noch restliche infektiöse Phagen enthielten, die der Essigsäurebehandlung entgangen waren (s. ET, S.115). Dazu wurden E.coli-Bakterien des Stammes AB301 aus einer frischen Übernachtskultur mit Verdünnungen der gelösten Niederschläge auf Petrischalen gemischt und mit CW-Agar ausplattiert (Plaquetest, s. ET, S119). Die Platten enthielten nach Inkubation bei 37° C im Brutschrank über Nacht Plaques. Demnach war anzunehmen, daß noch infektiöse Phagen in den gelösten Niederschlägen vorhanden waren. Es gelang jedoch nicht, diese restlichen Phagen bei 40.000 Upm im Ti 50-Rotor für 30 Minuten aus der Lösung abzuzentrifugieren, was der Plaquetest durch gleiche pfu's (plaquebildende Einheiten) vor und nach der Zentrifugation anzeigte. Es schien daher zweifelhaft, ob die gemessenen infektiösen Einheiten tatsächlich ganze Phagen waren. Wäre dies der Fall, so sollte die Infektiosität unverändert sein nach RNase-Inkubation. Nach 15minütiger Inkubation der gelösten Niederschläge mit 2,5-5ypankreatischer RNase/ml bei 37° C war jedoch keine Infektiosität mehr nachweisbar. Dagegen blieb die Infektiosität einer Vergleichs-Phagenlösung von einer gleichartigen RNase-Inkubation unbeeinflusst.

Dieser Befund war ein weiterer Hinweis darauf, daß die Infektiosität der gelösten Essigsäureniederschläge nicht von restlichen Phagen stammte.

Da bis dahin angenommen wurde, daß nur ganze RNA-Phagen auf intakten E.coli-Wirtszellen infektiös sind, stellte sich die Frage, was das infektiöse Agens in den gelösten Niederschlägen war.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst Komponenten der Niederschläge auf Infektiosität geprüft. Dazu wurde die RNA mit Phenol aus den Niederschlägen isoliert (s. ET, S.119) und auf Infektiosität auf ganzen E.coli-Zellen getestet. Dabei wurde keinerlei Infektiosität beobachtet. Ebenso nicht infektiös war RNA, die mit Phenol aus den ganzen Phagen extrahiert worden war (s.ET, S.118). Diese Ergebnisse stehen in Übereinklang mit den in der Literatur beschriebenen, wonach Phagen-RNA keine intakten E.coli-Zellen infizieren kann. Dies gelingt erst nach Entfernung der Bakterienzellwand mit Lysozym.

Die RNA allein war also nicht für die Infektiosität der gelösten Niederschläge verantwortlich. Da in den Niederschlägen außer der RNA und dem A-Protein ein geringer Anteil des Coatproteins der Phagen vorlag (s.S. 13), wurden ferner der mit Phenol aus den Niederschlägen und aus den ganzen Phagen isolierten RNA steigende Mengen Coatprotein zugesetzt, so daß die Molekülverhältnisse RNA-Coatprotein von 1:0,2 bis 1:5 variierten (zur Coatproteinisolierung s. ET, S.125). Diese Gemische wurden auf Infektiosität auf ganzen Bakterienzellen getestet. Sie erwiesen sich alle als nicht infektiös.

Nach diesen Resultaten war klar, daß die Infektiosität der gelösten Niederschläge weder von der RNA allein noch von der RNA zusammen mit Coatprotein verursacht werden konnte. So war zu vermuten, daß das A-Protein zusammen mit der RNA die Infektiosität bewirkte.

Wegen der RNase-Sensitivität der Infektiosität der gelösten Niederschläge wurde versucht, die Infektionsbedingungen im Hinblick auf RNase-Freiheit der E.coli-Zellen zu verbessern.

Der verwendete E.coli-Wirtsstamm AB301 ist zwar ein RNase I⁻ Stamm, aber er besitzt eine Restaktivität an RNase I

von weniger als 1% der Aktivität des Wildtypstammes (Gesteland, 1966). Da man annehmen muß, daß in jeder Bakterienkultur einige Zellen lysiert sind, können sich diese Restaktivitäten an RNase I der lysierten Zellen im Medium befinden und so bei Infektion der Bakterien mit den RNase I-sensitiven gelösten Niederschlägen diese zum Teil verdauen. Zur Entfernung dieser RNase I-Aktivitäten wurden E.coli-Bakterien abzentrifugiert und mit frischem Medium gewaschen. Sie wurden dann im Ausgangsvolumen frischen Mediums suspendiert.

Der Plaquetest mit diesen gewaschenen Zellen zeigte eine um ca. den Faktor 10 gesteigerte Infektiosität der gelösten Niederschläge gegenüber dem Test mit ungewaschenen Zellen. Die Infektiosität erhöhte sich weiter um ca. den Faktor 2, wenn die gewaschenen Bakterien vor dem Ausplattieren für 10 Minuten bei 37° C mit Aliquots der gelösten Niederschläge inkubiert wurden. Bei längerer Inkubation (15, 20, 30 Minuten) wurde die Infektiosität nicht weiter gesteigert. In Tabelle 2 sind die Resultate der Infektiositätsteste zusammengestellt.

Maximale Infektiosität wird also beobachtet, wenn gewaschene E.coli-Bakterien für 10 Minuten bei 37° C mit Aliquots der gelösten Niederschläge inkubiert werden. Dieser abgewandelte Plaquetest wird Infektiositätstest genannt und im folgenden stets zur Ermittlung der Infektiosität der gelösten Essigsäureniederschläge verwendet (s. ET, S.120).

In den Infektiositätstesten wurden ca. $1,2 \times 10^6$ Plaques erhalten, wenn pro Ansatz $1,2 \times 10^{13}$ infektiöse Phagen zur Isolierung der Essigsäureniederschläge eingesetzt worden waren. Dies entspricht einer Infektiositätsausbeute von ca. 10^{-7} Plaques pro eingesetztem infektiösen M12-Phagen.

Tabelle 2

Probe	Infektiosität (pfu's) ⁺ vor dem RNaseI-Verdau	Infektiositätsausbeute (pfu's/einges. M12)	Infektiosität (pfu's) nach dem RNase I-Verdau
M 12	1,2 x 10 ¹³	1	1,2 x 10 ¹³
Essigsäure- niederschlag	A 1,5 x 10 ⁶	1,25 x 10 ⁻⁷	0
	B 1,2 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁻⁷	0
	C 1,3 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁻⁷	0
RNA des Essig- säurenieder- schlages	A 0	0	-
	B 0	0	-
	C 0	0	-
RNA des Essig- säurenieder- schlages + Coatprotein	A 0	0	-
	B 0	0	-
	C 0	0	-
RNA aus den Phagen isoliert	A 0	0	-
	B 0	0	-
	C 0	0	-
RNA aus den Phagen isoliert + Coatprotein	A 0	0	-
	B 0	0	-
	C 0	0	-

Ergebnisse der Infektiositätsteste auf intakten Bakterienzellen des E.coli-Stammes AB301. Die Probenpräparation ist im Text beschrieben. Bei der RNase-Behandlung wurden die Proben in Puffer II mit 2,5 - 5_γRNase A/ml für 15 Minuten bei 370 C inkubiert und anschließend im Infektiositätstest untersucht (s.ET, S.120). Zeile 1 gibt die Zahl der infektiösen M12-Phagen an, die zur Isolierung der Essigsäureniederschläge eingesetzt wurden. A, B, C bezeichnen jeweils 3 parallel getestete Proben.

⁺ pfu's: plaquebildende Einheiten.

- d) Identifizierung eines infektiösen RNA-A-Proteinkomplexes in den gelösten Essigsäureniederschlägen im Saccharosegradienten.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wurde die These aufgestellt, daß A-Protein und RNA einen Komplex bilden, der infektiös für E.coli ist. Um diese These zu prüfen, wurden in Puffer II gelöste Essigsäureniederschläge im Saccharosegradienten auf die Verteilung von RNA, A-Protein und Infektiosität analysiert.

Um das A-Protein in den Gradientenfractionen auf einfache Weise messen zu können, wurden M12-Phagen zur Isolierung eines Essigsäureniederschlags verwendet, in denen das A-Protein mit der radioaktiven Aminosäure ^3H -Histidin markiert war. Dazu wurden $1,2 \times 10^{14}$ Phagen (10% der Phagen waren infektiös) in einer Konzentration von 1,5 mg M12/ml für 5 Minuten mit 66%iger Essigsäure gefällt (s.ET,S.115). Der Essigsäureniederschlag wurde in Puffer II gelöst. Die Lösung wurde auf einen Saccharosegradienten geschichtet und zentrifugiert. Abb. 6 stellt das Ergebnis dar. Die Infektiosität bandiert in einem scharfen Gipfel in Fraktion 13. Die Summe aus den Infektiositäten der Gipfelfractionen ergab $1,4 \times 10^6$ Plaques. Die gleiche Plaquezahl wurde im Infektiositätstest für den gelösten Essigsäureniederschlag vor der Saccharosegradientenanalyse erhalten.

Das RNA-Profil im Gradienten zeigt einen großen Gipfel in Fraktion 15 und mehrere kleinere in den Fraktionen zum Gradientenmeniskus hin an. Um zuordnen zu können, in welchem Gipfel intakte RNA-Moleküle sedimentierten, wurde in einem parallelen Saccharosegradienten ^{32}P -markierte Phagen-RNA, die mit Phenol isoliert worden war, als Marker für intakte RNA-Moleküle zusammen mit einer Lösung eines unmarkierten Essigsäureniederschlags, der unter den gleichen Bedingungen isoliert worden war wie der mit ^3H -Histidin

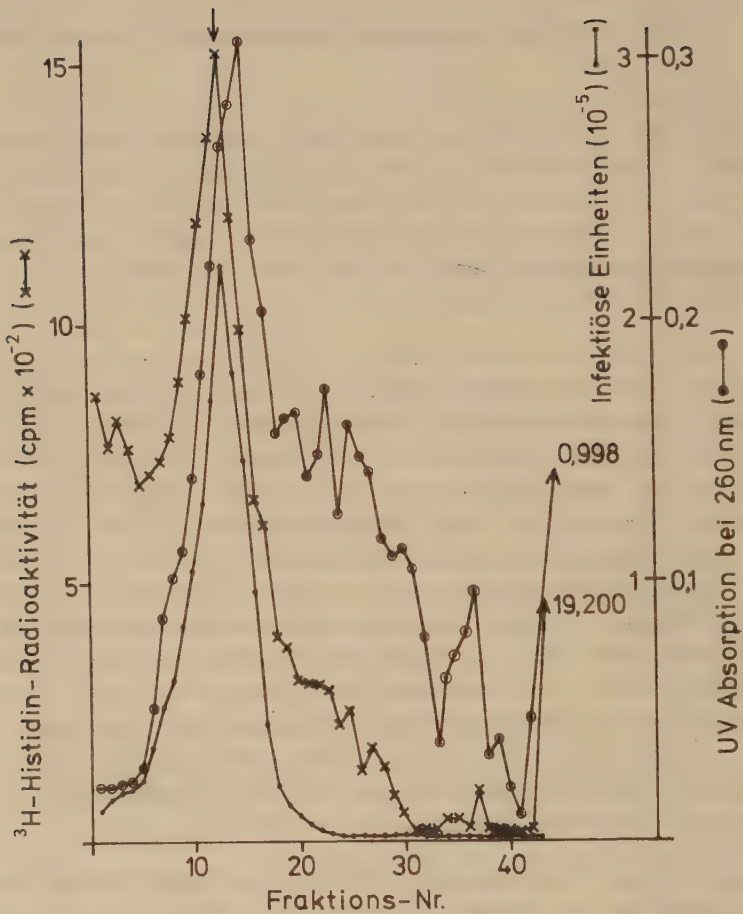


Abb. 6: Verteilung der Infektiosität, der RNA und des A-Proteins in einem Saccharosegradienten, der mit der Lösung eines mit ^3H -Histidin-markierten Essigsäureniederschlages in Puffer II beschickt wurde (15 - 30% Saccharose in Puffer II, SW 41-Rotor, 20 Stunden bei 35.000 Upm und 0°C). Die Infektiosität der Fraktionen wurde mit dem Infektiositätstest bestimmt, der RNA-Gehalt wurde UV-spektrioskopisch ermittelt und der A-Proteingehalt wurde an der ^3H -Histidinradioaktivität gemessen (s. ET, S. 123). Der Pfeil gibt die Positionen von intakten RNA-Molekülen an.

markierte, im Saccharosegradienten zentrifugiert. In diesem Gradienten koinzidierte in Fraktion 13 der Infektiositätsgipfel mit dem ^{32}P -Gipfel der intakten Phenol-RNA, während der große Gipfel der unmarkierten RNA des Essigsäureniederschlages in Fraktion 15 lag.

Daraus läßt sich schließen, daß in Abb. 6 der Gipfel der intakten RNA-Moleküle in Fraktion 13 liegt. Die langsamer sedimentierende RNA muß daher aus kleineren Molekülen bestehen als die intakte RNA, wenn man mögliche Konformationseinflüsse auf die Sedimentationsgeschwindigkeit vernachlässigt. Diese kleineren RNA-Moleküle könnten durch saure Hydrolyse bei der Essigsäurebehandlung der Phagen entstanden sein. Der RNA-Gipfel in Fraktion 15 ist als Überlagerung aus intakter RNA, die in Fraktion 13 sedimentiert, und hydrolysiert RNA zu erklären.

Das ^3H -Histidinradioaktivitätsprofil zeigt, daß ein Teil des A-Proteins in einem scharfen Gipfel in Fraktion 13 bandiert, während ein weiterer Teil offenbar in Form von Aggregaten unterschiedlich schnell sedimentiert.

Die Gipfel des A-Proteins und der intakten RNA liegen also in derselben Fraktion.

Dies ist eine starke Evidenz dafür, daß der A-Proteingipfel durch Bindung des A-Proteins an die RNA zustandekommt, d.h. also, ein RNA-A-Proteinkomplex vorliegt. Ob dies tatsächlich der Fall ist, läßt sich zeigen, indem man versucht, die an A-Protein gebundene RNA des Komplexes in den Gradientenfraktionen mit dem Nirenberg-Filtertest (1964) in der Modifikation nach Godson und Sinsheimer (1967) nachzuweisen. In diesem Test wird proteingebundene RNA auf Milliporefiltern zurückgehalten, während freie RNA größtenteils durch das Filter läuft.

Für den Nachweis der im Komplex gebundenen RNA wurden aus ^{32}P -markierten Phagen (10% der Phagen waren infektiös) unter

den gleichen Bedingungen wie bei den ^3H -Histidin-markierten Phagen (s. ET, S.115) zwei Essigsäureniederschläge isoliert. Der eine Niederschlag wurde in Puffer II gelöst und diente zur Bestimmung der proteingebundenen RNA.

Der zweite Niederschlag wurde in STE-Puffer + 1% SDS gelöst. Aus ihm wurde mit Phenol die RNA isoliert (s.ET, S.119) und ebenfalls in Puffer II gelöst. Diese RNA-Lösung stellte die Kontrolllösung dar, mit der festgestellt werden sollte, zu welchem Anteil reine RNA auf den Filtern im Nirenberg-Test zurückgehalten wird.

Die Lösung des Essigsäureniederschlages als auch die der RNA wurde gleichzeitig in zwei Saccharosegradienten unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Von den Gradientenfraktionen wurde die Infektiosität die Gesamt-RNA, gemessen an TCA-gefällter ^{32}P -Radioaktivität und die im Komplex gebundene RNA mit Hilfe des Nirenberg-Testes (s. ET, S.124) bestimmt.

In Abb. 7 ist zu erkennen, daß ein Teil der RNA des gelösten Essigsäureniederschlages im Nirenberg-Filtertest gebunden wird, d.h. also an Protein komplexiert ist. Diese RNA-Moleküle bandieren in einem scharfen Gipfel in der Position intakter RNA-Moleküle in Fraktion 13.

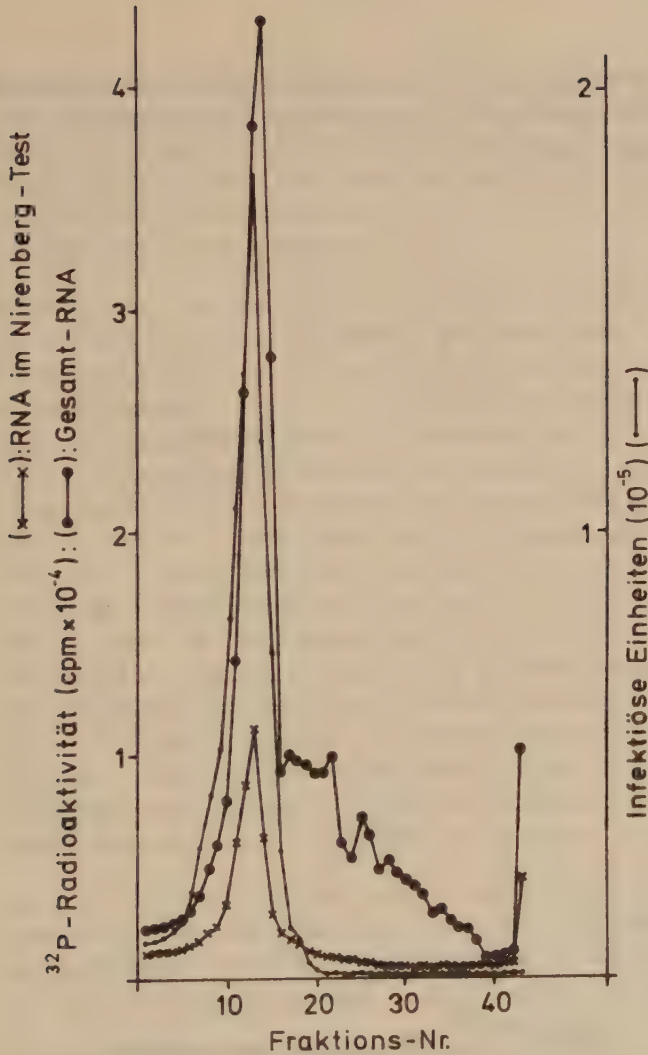


Abb. 7: Verteilung der Infektiosität, der gesamten RNA und der im Nirenberg-Test zurückgehaltenen RNA in einem Saccharosegradienten, der mit einer Lösung eines mit ^{32}P -markierten Essigsäureniederschlags in Puffer II beschickt wurde (15 - 30% Saccharose in Puffer II, SW 41-Rotor, 20 Stunden bei 35.000 Upm und 0°C).

Abb. 8 zeigt, daß im Unterschied dazu die Kontroll-RNA im Gipfelbereich nur in geringem Ausmaße auf Milliporefiltern zurückgehalten wird (ca. 2%).

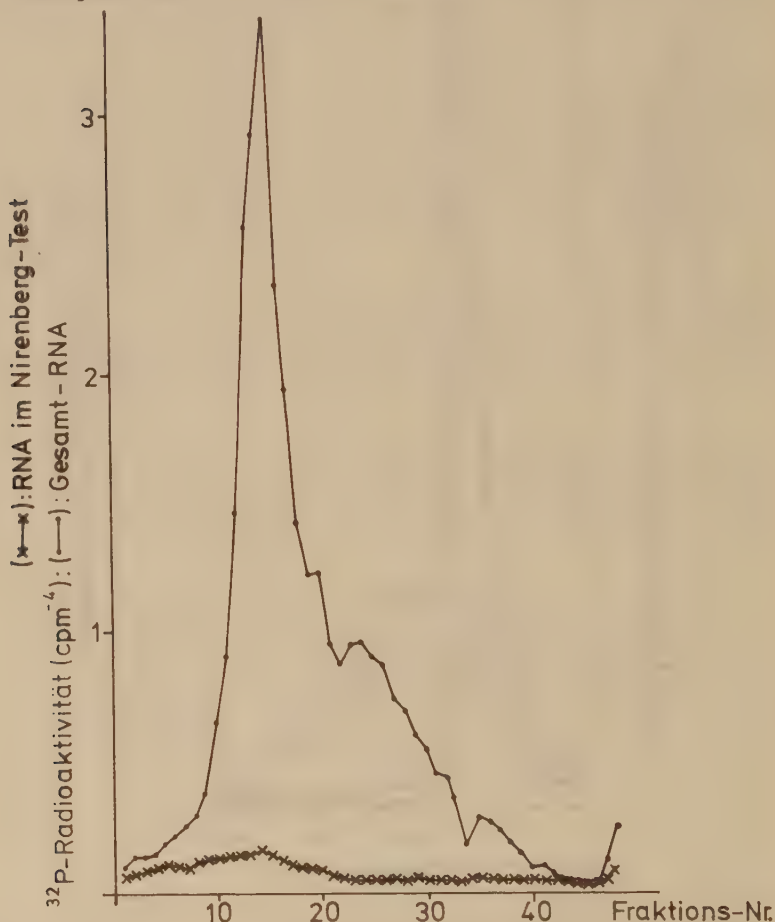


Abb. 8: Verteilung der gesamten RNA und des im Nirenberg-Filtertest zurückgehaltenen RNA-Anteils im Saccharosegradienten, der mit einer Lösung einer RNA in Puffer II, die mit Phenol aus einem ^{32}P -markierten Essigsäureniederschlag isoliert wurde, beschickt wurde (15 - 30% Saccharose in Puffer II, SW 41-Rotor, 20 Stunden bei 35.000 Upm und 0°C).

Da sowohl in Abb. 6 als auch in Abb. 7 der A-Proteingipfel bzw. der Gipfel proteingebundener RNA jeweils mit dem Infektiositätsgipfel koinzidiert, ergibt sich, daß die im Nirenberg-Test zurückgehaltenen RNA-Moleküle an A-Protein gebunden sind und dieser RNA-A-Proteinkomplex infektiös ist gegenüber E.coli-Zellen.

Es wurde nun versucht, das Molekülverhältnis zwischen der RNA und dem A-Protein im Komplex herauszufinden. Dazu mußten die Zahlen der im Komplex vorhandenen RNA- und A-Proteinmoleküle bekannt sein. Die Zahl der RNA-Moleküle im Komplex war in einfacher Weise zu berechnen aus der ^{32}P -Radioaktivitätssumme der Fraktionen des Gipfels der proteingebundenen RNA, die im Nirenberg-Filtertest gemessen worden war (s. Abb. 7). Diese Summe wurde korrigiert um den Prozentsatz, zu dem reine Phenol-RNA aus dem Essigsäureniederschlag im Gipfelbereich im Nirenberg-Test zurückgehalten wird (s. Abb. 8). Nach dieser Rechnung lagen etwa 10 % der Markierung der Gesamt-RNA im Gipfel der RNA des Komplexes vor. Mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten für die M12-RNA wurde die spezifische Radioaktivität der ^{32}P -RNA UV-spektroskopisch ermittelt (s. ET, S.114) und dadurch bestimmt, daß die ^{32}P -Radioaktivität der im Komplex gebundenen RNA $1,2 \times 10^{13}$ Molekülen entsprach.

Als nächstes wurde die Zahl der im Komplex gebundenen A-Proteinmoleküle aus der Summe der ^3H -Histidinradioaktivität der Fraktionen unter dem A-Proteingipfel kalkuliert (s. Abb. 6). Dabei ist folgendes zu berücksichtigen.

Zu beiden Seiten des A-Proteingipfels bandiert A-Proteinradioaktivität, die nicht an die RNA gebunden sein kann, da in diesen Gradientenfraktionen keine proteingebundene RNA im Nirenberg-Filtertest gefunden wurde. Man muß daher annehmen, daß diese Radioaktivität von A-Proteinaggregaten verschiedener Größe stammt, die in unterschiedlichem Ausmaß über den ganzen Gradienten verteilt sedimentieren.

Vorwiegend scheinen größere A-Proteinaggregate vorhanden zu sein, da links des A-Proteingipfels, also zum Gradientenboden hin, wesentlich mehr Histidinradioaktivität auftritt als rechts zum Gradientenmeniskus hin. Ferner finden sich am Gradientenboden ca. 50% der Histidinradioaktivität des A-Proteins, die offenbar aus so großen A-Proteinaggregaten zusammengesetzt sind, daß sie während der Gradientenzentrifugation zu Boden sedimentierten. Obwohl die A-Proteinaggregate im Gradienten von links nach rechts stark abnehmen, muß doch davon ausgegangen werden, daß ein kleiner Teil der Histidinradioaktivität des A-Proteingipfels von A-Proteinaggregaten stammt. Das gemessene Profil des A-Proteingipfels A_G resultiert also offenbar aus der Überlegung der Profile des A-Proteins des Komplexes A_K und der A-Proteinaggregate A_A . Es gilt also:

$$A_G = A_K + A_A$$

Bei der Bestimmung der A-Proteinkurve des Komplexes unter dem A-Proteingipfel A_G wurde von der Überlegung ausgegangen, daß der RNA-A-Proteinkomplex infektiös ist.

Daher muß das Infektiositätsprofil das Profil des Komplexes widerspiegeln. Man kann sich deshalb zur Ermittlung des 'wahren' Gipfels des komplex gebundenen A-Proteins an dem Profil des Infektiositätsgipfels orientieren. Dann gilt, daß der prozentuale Anteil des gebundenen A-Proteins in jeder Fraktion unter dem Infektiositätsgipfel derselbe ist wie der prozentuale Anteil der Infektiosität in jeder Fraktion. Man wählt nun eine Fraktion aus dem Infektiositätsgipfel aus, in der die Infektiosität fast den Backgroundwert erreicht hat, z.B. Fraktion 20. In dieser Fraktion muß auch der Wert des im Komplex gebundenen A-Proteins fast den Backgroundwert erreicht haben, so daß die gemessene Radioaktivität in dieser Fraktion vorwiegend von A-Proteinaggregaten stammt. Weist man der vom

A-Proteinkomplex stammenden Radioaktivität einen festen Wert zu, so kann man davon ausgehend alle anderen Radioaktivitäten der Fraktionen der A-Proteinkurve des Komplexes berechnen. Die erhaltenen Absolutwerte hängen natürlich davon ab, wie groß der Wert in Fraktion 20 festgesetzt wurde. Nach oben ist die Wertzuweisung durch die Berechnungsmethode begrenzt, da bei zu groß gewählten Werten für die Fraktionen des A-Proteins des Komplexes höhere Werte erhalten werden als in der gemessenen A-Proteingipfelkurve, was unsinnig ist. Nach unten ist die Wertzuweisung für die Fraktion 20 durch die Berechnungsmethode offen. Man muß daher einen vernünftigen Wert auswählen. Vernünftig ist ein Wert dann, wenn die resultierende berechnete A-Proteinaggregatskurve die fallende Tendenz von links nach rechts, die gemessen wurde, auch unter dem Gipfel wiedergibt.

Für die vom Komplex stammende A-Proteinradioaktivität in Fraktion 20 wurde ein Wert von 70 cpm festgesetzt. Nach dieser Wertzuweisung errechnete sich das A-Protein des Komplexes. Subtrahierte man die für den Komplex errechneten Werte von den gemessenen Radioaktivitäten, so erhielt man die A-Proteinaggregatskurve.

Die errechneten Werte sind in Tab. 3 eingetragen.

Wie erwartet fällt die Aggregatskurve links des Proteingipfels steiler ab als die gemessene Kurve, da in dieser der ansteigende A-Proteinkomplex die Aggregate in den ersten Fraktionen in steigendem Maße von links nach rechts überlagert.

Für die Summe der Radioaktivität des A-Proteins des Komplexes ergibt sich aus der Rechnung ein Wert von 9×10^3 cpm, die 11% der Radioaktivität des gesamten A-Proteins des gelösten Essigsäureniederschlages ausmachen. D.h., nach dieser Kalkulation sind 11 % des vorhandenen A-Proteins in einem RNA-A-Proteinkomplex gebunden.

Tabelle 3

Fraktions-Nr. Infektiosität im Saccharose-
gradienten d. Abb. 6

Fraktions-Nr.	Infektiosität im Saccharose- gradienten d. Abb. 6	Infektiosität (pfu's)	(in %)	Radioaktivität (cpm)	³ H-Histidin errechnete Radio- aktivität des A- proteins im Kom- plex (cpm)	errechnete Radio- aktivität der A-Proteinaggre- gate (cpm)
1		14300	1,0	872	88	784
2		16600	1,1	760	102	658
3		18000	1,2	813	111	702
4		21500	1,5	751	132	619
5		26200	1,8	680	161	519
6		35800	2,4	705	220	485
7		52600	3,6	725	323	402
8		67000	4,5	770	412	358
9		82500	5,6	875	508	367
10		104500	7,1	1004	642	362
11		128000	8,7	1180	787	393
12		171000	11,6	1357	1050	307
13		222000	14,4	1522	1300	222
14		182000	12,4	1208	1119	89
15		147500	10,0	981	906	75
16		96300	6,5	656	592	64
17		44000	2,9	603	263	340
18		21200	1,4	382	131	251
19		13300	0,9	375	82	293
20		11400	0,8	307	70	237

Ergebnisse der Kalkulation, mit der das A-Protein, das im Komplex gebunden ist, und die A-Protein-
aggregate berechnet wurden anhand des gemessenen ³H-Histidin-Radioaktivitäts- und Infektiositäts-
profiles in Abb. 6.

Die im Komplex gebundene A-Proteinradioaktivität könnte nun mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität des A-Proteins einer bestimmten Zahl von A-Proteinmolekülen zugeordnet werden. Da die spezifische Radioaktivität des A-Proteins jedoch unbekannt ist, muß die Zuordnung anders getroffen werden. So kann man kalkulieren, wieviel A-Proteinmolekülen die 11% des A-Proteins entsprechen, wenn bekannt ist, wieviel A-Proteinmoleküle in den verwendeten M12-Phagen vorhanden sind. In der Einleitung war erwähnt worden, daß RNA-Phagen allgemein ein Molekül A-Protein enthalten. Wie jedoch in späteren Kapiteln noch berichtet werden wird, kann man keineswegs von einem konstanten A-Proteingehalt in den Phagen ausgehen. Vielmehr ist der A-Proteingehalt der Phagen abhängig von ihrer Präparation (s. S.82) und von der Anzahl der CsCl-Gradienten, über die sie gereinigt wurden. Die hier verwendeten Phagen waren über einen CsCl-Gradienten zentrifugiert worden. Man muß daher annehmen, daß sie 1,2 - 0,5 Moleküle A-Protein pro Phage enthielten (s. Tab.8) Legt man diesen Zahlenbereich zugrunde, so sind in dem Essigsäureniederschlag zwischen $1,4 - 0,6 \times 10^{14}$ Moleküle A-Protein vorhanden, da zu seiner Isolierung $1,2 \times 10^{14}$ Phagen eingesetzt worden waren und das gesamte A-Protein im Essigsäureniederschlag vorliegt. Die 11% des A-Proteins, die im Komplex gebunden sind, entsprechen dann $1,5 - 0,7 \times 10^{13}$ Molekülen A-Protein.

Der Nirenberg-Filtertest hatte $1,2 \times 10^{13}$ RNA-Moleküle im Komplex angezeigt.

Aus beiden Resultaten ergibt sich das Molekülverhältnis zwischen der RNA und dem A-Protein im Komplex zu 1:1,3 bis 1:0,6. Wegen der nicht genau festlegbaren Zahl der A-Proteinmoleküle resultiert aus dieser Kalkulation also nur ein Wertbereich aber kein exakter Wert für das Molekülverhältnis im Komplex. Bildet man das arithmetische Mittel aus beiden Grenzwerten, so beträgt das Molekülverhältnis zwischen RNA und A-Protein im Komplex 1:1.

Eine genauere Kalkulation für die Zahl der im Komplex gebundenen A-Proteinmoleküle ist möglich, wenn beide Phagenproteine mit ^{35}S markiert werden, weil dann die Zahl der A-Proteinmoleküle über die bekannte spezifische Radioaktivität des Coatproteins errechnet werden kann (s. S.126). Dazu wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei den ^3H -Histidin-Phagen ein Essigsäureniederschlag aus ^{35}S -Phagen isoliert und nach Lösen in Puffer II im Saccharosegradienten analysiert. Das Infektiositäts-, RNA- und Proteinprofil des Gradienten wurde bestimmt wie in Abb. 6 beschrieben. Abb. 9 zeigt das Ergebnis.

Auch in diesem Gradienten bandieren die Infektiosität und ein Teil der Proteinradioaktivität gemeinsam in einem Gipfel in Fraktion 13. Die rechts und links des Proteingipfels bandierende Radioaktivität muß A- und Coatproteinaggregaten zugeschrieben werden, so daß davon auszugehen ist, daß auch unter dem Komplexgipfel ein Teil der Proteinradioaktivität von Aggregaten stammt. Das gemessene Proteinprofil des Komplexes wird also auch hier wieder überlagert von Proteinaggregaten. Die von den Aggregaten stammende Radioaktivität unter dem Komplexgipfel muß dann von den gemessenen Radioaktivitäten subtrahiert werden, um die Netto-radioaktivität des im Komplex gebundenen Proteins zu erhalten. Die in Proteinaggregaten und im Komplex vorliegende Proteinradioaktivität wurde kalkuliert wie bei der Probe aus den ^3H -Histidin-markierten Phagen unter der Annahme, daß die gesamte ^{35}S -Radioaktivität des Komplexes von A-Proteinmolekülen stammt (vergl. hierzu S.32).

Die Ergebnisse der Kalkulation sind in Tab. 4 angegeben. Daraus resultierten $1,4 \times 10^4$ cpm als Radioaktivitätssumme der Fraktionen des im Komplex gebundenen A-Proteins. Dieser Wert entspricht 0,13% der gesamten in den Phagen vorhandenen Radioaktivität ($1,075 \times 10^7$ cpm). Werden die Proteine aus diesen Phagen isoliert, und auf einem Polyacrylamidgel

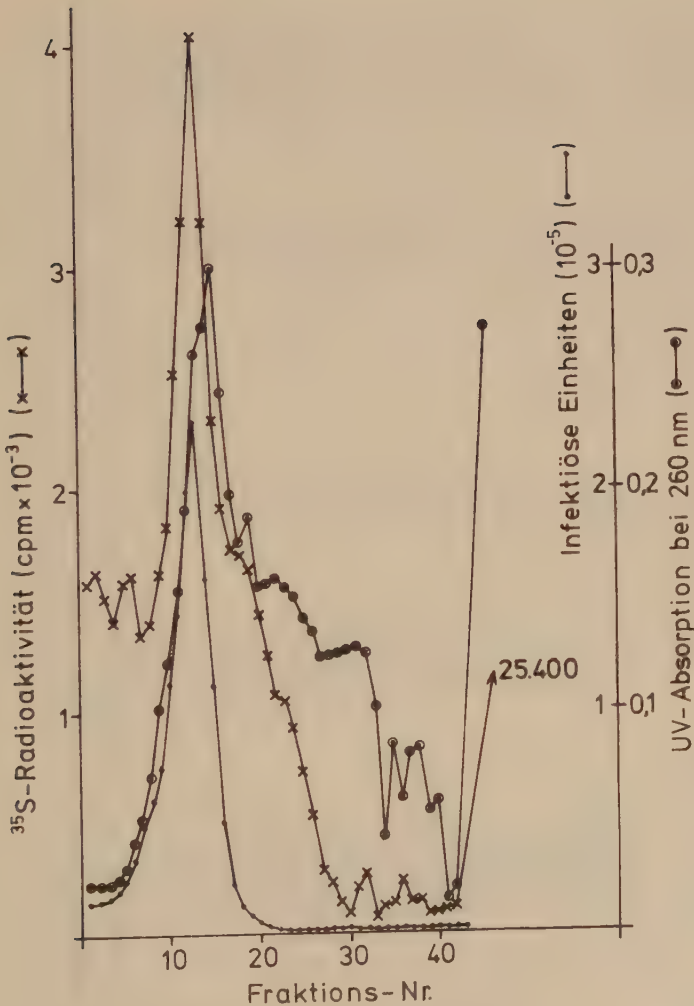


Abb. 9: Verteilung der Infektiosität, der RNA und des A- und Coatproteins in einem Saccharosegradienten, der mit der Lösung eines mit ^{35}S -markierten Essigsäureniederschla- ges in Puffer II beschickt wurde (15 - 30% Saccharose in Puffer II, SW 41-Rotor, 20 Stunden bei 35000 Upm und 0°C).

Tabelle 4

Fraktions-Nr. im Saccharose- gradienten der Abb. 9	Infektiosität (pfu's)	Infektiosität (in %)	gemessene ³⁵ S- Radioaktivität (cpm)	errechnete Ra- dioaktivität des A-Proteins im Komplex (cpm)	errechnete Ra- dioaktivität des Proteins aggregat (cpm)
1	12600	1,0	1572	129	1443
2	14000	1,0	1641	144	1497
3	15670	1,2	1509	161	1348
4	18600	1,4	1403	191	1212
5	23100	1,7	1568	237	1331
6	32800	2,4	1597	336	1261
7	48000	3,6	1329	493	836
8	58700	4,4	1403	603	800
9	73500	5,5	1612	755	857
10	115500	8,6	1831	1185	646
11	143500	10,6	2534	1475	1059
12	199300	14,8	3209	2050	1159
13	230000	17,0	4058	2310	1748
14	159500	11,8	3211	1635	1576
15	110000	8,2	2319	1130	1189
16	49800	3,7	1913	510	1403
17	21000	1,6	1732	215	1517
18	11900	0,9	1694	122	1572
19	9200	0,7	1635	95	1540
20	4870	0,4	1427	50	1377

Ergebnisse der Kalkulation, mit der das A-Protein des Komplexes und die Radioaktivität der Proteinaggregate berechnet wurden anhand des gemessenen ³⁵S-Radioaktivitätsprofils in Abb. 9.

untersucht, so finden sich 0,9% der gesamten Radioaktivität im A-Proteinbereich des Gels. Danach sind 14% des gesamten in den Phagen vorhandenen A-Proteins im Komplex gebunden. Wieviel A-Proteinmolekülen diese 14% entsprechen, kann nun bestimmt werden unter der Annahme, daß A- und Coatprotein in gleicher Weise mit ^{35}S markiert sind. Dann enthält ein Molekül A-Protein 2,8 x soviel Radioaktivität wie ein Molekül Coatprotein entsprechend seinem 2,8fachen Molekulargewicht (s. S. 86). Wird die Radioaktivität des A-Proteins im Komplex durch 2,8 dividiert, so errechnet sich mit Hilfe der bekannten spezifischen Radioaktivität des Coatproteins ($2,067 \times 10^4$ cpm/ γ) direkt die Anzahl der im Komplex gebundenen A-Proteinmoleküle zu $1,1 \times 10^{13}$.

Da im Komplex $1,2 \times 10^{13}$ RNA-Moleküle vorliegen, ergibt sich für den Komplex ein Molekülverhältnis zwischen RNA und A-Protein von 1 : 0,9. Dies stimmt gut überein mit dem arithmetischen Mittelwert für das Molekülverhältnis, der aus der Kalkulation mit den ^3H -Histidin-markierten Phagen erhalten wurde. Nach den Resultaten beider Kalkulationen ist demnach nicht mehr als ein Molekül A-Protein an ein Molekül RNA im Komplex gebunden.

Aus der Analyse der in den Fraktionen 8 - 16 enthaltenen Proteine auf einem Polyacrylamidgel (s. ET, S.124) ergibt sich, daß unter dem ^{35}S -Proteingipfel in Abb. 9 außer dem A-Protein auch Coatprotein bandiert. Im Gel (s. Abb. 10) betrug das Markierungsverhältnis zwischen der Radioaktivität des A- und Coatproteingipfels 1,5. Das bedeutet, daß 2/5 der gesamten Radioaktivität in den Fraktionen 8 - 16 des Gradienten dem Coatprotein zugehören.

Es ist anzunehmen, daß diese Radioaktivität in Coatproteinaggregaten unterschiedlicher Größe vorliegt, da diese auch beiderseits des Komplexgipfels sedimentieren. Anhand der experimentellen Daten ist jedoch nicht zu entscheiden, ob

es ausschließlich in Aggregaten vorkommt oder ob ein Teil davon an die RNA gebunden ist. Es ist nämlich nicht möglich, das Coatprotein selektiv gegenüber dem A-Protein radioaktiv zu markieren und dadurch direkt, wie beim A-Protein, eine Bindung an die RNA zu demonstrieren.

Die Resultate aus anderen Experimenten in den folgenden Kapiteln deuten stark darauf hin, daß kein Coatprotein an die RNA gebunden vorliegt. Bezieht man diese Ergebnisse in die hiesige Betrachtung ein, so ist das unter dem Komplexgipfel bandierende Coatprotein quantitativ Aggregaten zuzuordnen.

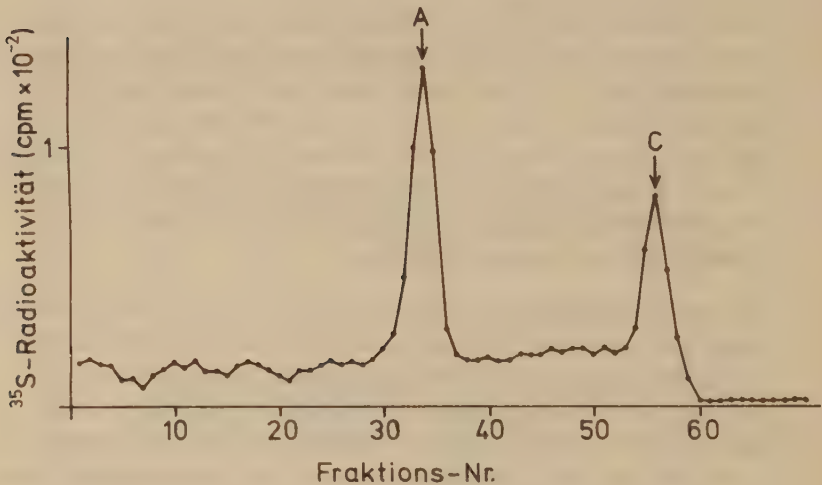


Abb. 10: Radioaktivitätsprofil ^{35}S -markierter Proteine, die durch Phenolisieren aus den vereinten Gradientenfraktionen 8 - 16 in Abb. 9 erhalten wurden, nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wanderten von der Kathode zur Anode (von links nach rechts). Die Pfeile bezeichnen die Positionen des A- und Coatproteins.

Die Abb. 6 und 9 zeigen, daß das nicht im Komplex gebundene A-Protein sowie das Coatprotein über die ganzen Gradienten verteilt in Form von Aggregaten vorliegen, wobei sehr große Aggregate bei der Gradientenzentrifugation zu Boden sedimentierten und sich am Boden der Gradientenröhrchen wiederfanden.

Dieses Vorliegen von Proteinaggregaten in wäßriger Lösung stimmt völlig überein mit dem von Argetsinger-Steitz (1968 b) und von Roberts und Argetsinger-Steitz (1967) beschriebenen Verhalten von Strukturproteinen des RNA-Phagen R17, wonach besonders das A-Protein in wäßrigen Lösungen ohne denaturierende Agentien unlöslich ist und das Coatprotein sehr schnell aggregiert.

Es ist daher anzunehmen, daß auch die am Gradientenmeniskus bandierenden Proteinmoleküle überwiegend oder vollständig aggregiert vorliegen.

Das A-Protein des Phagen M12 ist also nach der Gradientenanalyse offensichtlich nur dann in Lösung zu halten, wenn es an die RNA gebunden als Komplex vorliegt, während es als freies Molekül aggregiert.

Zusammengefaßt erbrachte die Saccharosegradientenanalyse der gelösten Essigsäureniederschläge folgende Ergebnisse:

- 1) In den gelösten Essigsäureniederschlägen liegen ca. 10% der RNA und ein Teil des A-Proteins als RNA-A-Proteinkomplex vor. Das Molekülverhältnis zwischen der RNA und dem A-Protein im Komplex ist ca. 1 : 1.
- 2) Das infektiöse Agens in den gelösten Essigsäureniederschlägen ist der RNA-A-Proteinkomplex.
- 3) Das nicht gebundene A-Protein liegt in Aggregaten vor, ebenso das Coatprotein.
- 4) Die nicht gebundene RNA ist größtenteils degradiert.
- 5) Ca. 1 - 2% der Gesamt-RNA liegen degradiert am Gradientenmeniskus an Protein gebunden vor.

e) Bestimmung der Bindungsart zwischen der RNA und dem A-Protein im Komplex

Es wurde davon ausgegangen, daß die Bindung zwischen der RNA und dem A-Protein im Komplex ionisch und nicht kovalent ist, weil RNA-Phagen durch hochmolare Harnstoff- oder Guanidinhydrochloridlösungen in ihre drei Komponenten RNA, A- und Coatprotein zerlegbar sind. (Hung u. Overby 1969, Argetsinger-Steitz 1968 b, Roberts u. Argetsinger-Steitz 1967).

Eine ionische Bindung zwischen der RNA und dem Protein im Komplex sollte unter geeigneten Bedingungen bei hohen Salzkonzentrationen dissoziierbar sein, während eine kovalente Bindung erhalten bliebe.

Dabei kann die Dissoziation des Komplexes auf zweierlei Weise verfolgt werden:

einmal durch die Messung der Abnahme der proteingebundenen RNA des Komplexes im Nirenberg-Test und zum zweiten durch die Messung der Abnahme der Infektiosität, weil die Infektiosität eine Eigenschaft des Komplexes ist.

Für die Untersuchung wurden aus je $1,4 \times 10^{14}$ ^{32}P -Phagen (10% der Phagen waren infektiös) zwei Essigsäureniederschläge isoliert (die Phagenkonzentration bei der Essigsäurefällung betrug 1,75 mg M12/ml) (s. ET, S.115).

Der eine Essigsäureniederschlag wurde in Puffer II gelöst.

Aus dem zweiten wurde die RNA mit Phenol isoliert (s. ET, S.119) und nach Umfällen ebenfalls in Puffer II gelöst.

Von beiden Lösungen wurde der Prozentsatz der RNA ermittelt, der im Nirenberg-Test auf dem Filter zurückgehalten wird (s. ET, S.125).

In der Lösung des Essigsäureniederschlages fanden sich 19% der gesamten RNA ($2,81 \times 10^5$ cpm) auf dem Filter, in der Kontroll-RNA-Lösung waren es 9%.

Nach Subtraktion der 9% der Kontroll-RNA blieben für die proteingebundene RNA des Komplexes 10% übrig ($1,63 \times 10^5$ cpm). Im Infektiositätstest wurden für den gelösten Essigsäureniederschlag $1,2 \times 10^6$ Plaques gezählt.

Nach der Ermittlung der proteingebundenen RNA und der Infektiosität wurde die Lösung des Essigsäureniederschlages halbiert. Zu der einen Hälfte wurde ein geeignetes Volumen Puffer III addiert, so daß die Endkonzentration an NaCl in der Lösung 0,5molar war: Lösung 1.

Zu der zweiten Hälfte wurde das gleiche Volumen Puffer II gegeben: Lösung 2. Sie diente als Kontrolllösung. Mit der RNA-Lösung wurde in entsprechender Weise verfahren: Lösung 1 und 2 sowie die beiden RNA-Lösungen wurden für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Danach wurde die Infektiosität und die proteingebundene RNA der Lösungen 1 und 2 getestet.

In der Lösung 1 waren der Anteil der proteingebundenen RNA und die Infektiosität unverändert gegenüber den Werten in dem gelösten Essigsäureniederschlag vor der Inkubation mit 0,5 m NaCl. Ebenso unverändert waren die Werte in der Kontrolllösung 2, wie in den beiden RNA-Lösungen. Damit war offensichtlich, daß der Komplex unter diesen Bedingungen durch hohes Salz nicht zu dissoziieren war, sondern sich als salzstabil erwies.

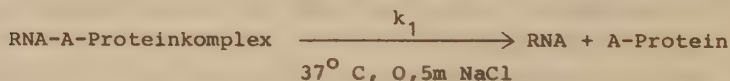
Dies änderte sich jedoch, wenn das gleiche Experiment bei 37°C wiederholt wurde. Jetzt waren die Infektiosität der Lösung 1 nach 30minütiger Salzininkubation auf ca. 2% und der Anteil der proteingebundenen RNA auf 10% der Gesamt-RNA gesunken, während die Werte in der Kontrolllösung 2 und den RNA-Lösungen unverändert waren.

Die Tatsache, daß der Komplex in einem 0,5molaren NaCl-Puffer bei 0°C innerhalb einer halben Stunde nicht

dissoziiert, wohl jedoch nach Temperaturerhöhung auf 37° C, spricht für eine starke ionische Bindung zwischen der RNA und dem A-Protein, die erst nach Zuführung von Aktivierungsenergie in Form von Wärme gelöst wird.

Um einen genauen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Komplexdissoziation zu gewinnen, wurde ihre Kinetik bei 37° C in 0,5 m NaCl-Puffer für 30 Minuten gemessen. Dazu wurden aus der Lösung 1 alle 5 Minuten Aliquots entnommen und deren Infektiosität und proteingebundene RNA ermittelt. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 5 zusammengestellt.

In Abb. 11 ist der zeitliche Verlauf der Komplexdissoziation anhand der proteingebundenen RNA des Komplexes und anhand seiner Infektiosität dargestellt. Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß sowohl die Infektiosität als auch die proteingebundene RNA exponentiell abnehmen. Diese Tatsache deutete darauf hin, daß der Komplex wie erwartet gemäß:



in einer monomolekularen Reaktion dissoziierte. Wenn dies der Fall ist, sollten die Werte innerhalb der Kinetik die Glchg. I für Reaktionen 1. Ordnung erfüllen, die den exponentiellen Zusammenhang wiedergibt:

$$c_x = c_A (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (\text{I})$$

Logarithmiert ergibt sich aus Glchg. I Glchg. II:

$$\ln \frac{c_A}{c_A - c_x} = k_1 \cdot t \quad (\text{II})$$

Tabelle 5

Zeit (Min.)	Infektiosität des Komplexes (pfu's)	$\ln \frac{C_A}{C_A - C_X}$, aus der Inf.d. Komplexes	Komplex-RNA (^{32}P -cpm)	$\ln \frac{C_A}{C_A - C_X}$, errechnet aus der Komplex-RNA
0	$1,2 \times 10^6$	0	$1,63 \times 10^5$	0
5	$6,60 \times 10^5$	0,60	$1,02 \times 10^5$	0,50
10	$2,76 \times 10^5$	1,47	$4,35 \times 10^4$	1,30
15	$1,97 \times 10^5$	1,80	$2,07 \times 10^4$	2,06
20	$5,76 \times 10^4$	3,00	$7,10 \times 10^3$	3,13
25	$3,64 \times 10^4$	3,50	-	-
30	$1,56 \times 10^4$	4,34	-	-

Kinetik der Dissoziation des RNA-A-Proteinkomplexes in 0,5 molarem NaCl-Puffer bei 37° C. Die Infektiosität des Komplexes wurde mit dem Infektiositätstest gemessen. Die im Komplex gebundene RNA wurde im Nirenberg-Filtertest bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte wurden jeweils um 9% der Gesamt-Radioaktivität ($1,33 \times 10^5$ cpm) korrigiert. Dies war der Anteil, zu dem reine Phenol-RNA aus dem Essigsäure-niederschlag auf den Filtern zurückgehalten wurde. Die gemessenen Werte für die proteingebundene RNA nehmen mit zunehmender Zeit stark ab und streben dem Wert reiner RNA zu. Deshalb wurden die zu den späten Zeitpunkten 25 und 30 Minuten gemessenen Werte von 139.000 cpm bzw. 135.000 cpm nicht um den Anteil der RNA von 133.000 cpm korrigiert, da die Differenz zwischen diesen Werten unterhalb der Auflösungsgrenze der Radioaktivitätsmessung liegt.

C_A ist die Anfangskonzentration des Komplexes vor der Salzkubation.

$C_A - C_X$ ist die zu jedem gemessenen Zeitpunkt noch vorhandene Restkonzentration des Komplexes.

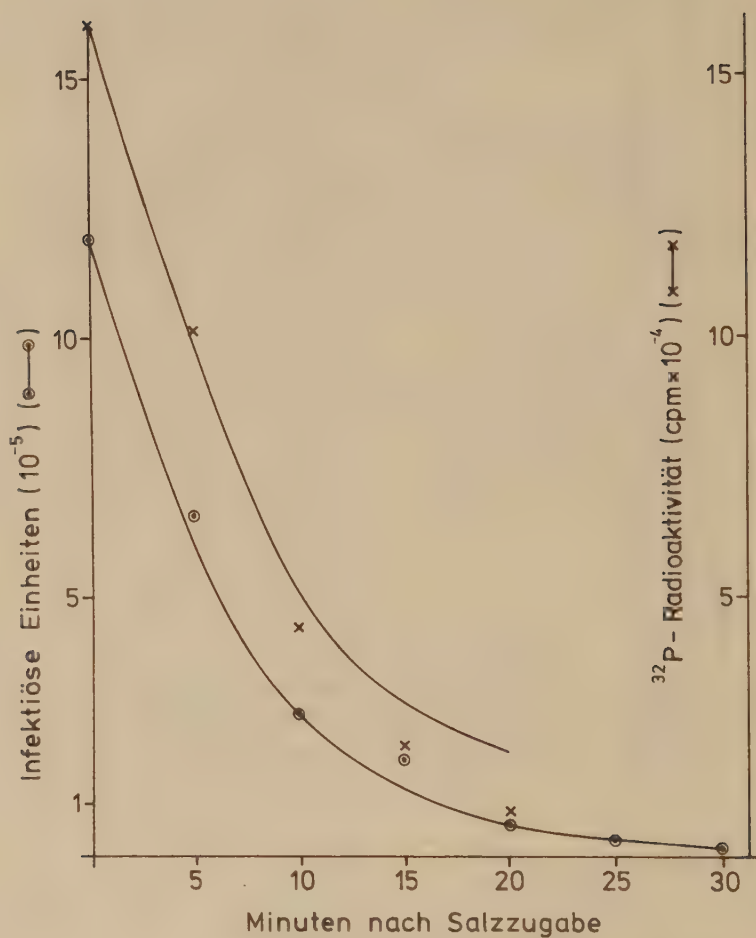


Abb. 11: Der zeitliche Verlauf der Dissoziation des RNA-A-Proteinkomplexes in 0,5 molarem NaCl-Puffer bei 37° C, gemessen an der ^{32}P -Radioaktivität der proteingebundenen Komplex-RNA und an der Infektiosität des Komplexes.

Dabei ist:

c_A = die Anfangskonzentration des Komplexes vor Beginn der Salzinkubation

c_x = die Konzentration eines durch die Dissoziation des Komplexes entstandenen Reaktionsproduktes

$c_A - c_x$ = die zu jedem Zeitpunkt noch vorhandene Restkonzentration des Komplexes

k_1 = die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

t = Zeit

Wird nach Glchg. II der natürliche Logarithmus des Quotienten aus der gemessenen Anfangskonzentration des Komplexes c_A und der Restkonzentration $c_A - c_x$ gegen die Zeit aufgetragen, so resultiert eine Gerade, deren Steigung die Geschwindigkeitskonstante k_1 angibt. Diese Gerade ist das graphische Kriterium dafür, daß es sich bei der Komplexdissoziation um eine Reaktion 1. Ordnung handelt.

Mit Hilfe der Glchg. II eröffnete sich eine weitere Möglichkeit, in einfacher Weise den kausalen Zusammenhang zwischen dem Komplex und der Infektiosität nachzuweisen. Danach sollten sich nämlich gleiche Geschwindigkeitskonstanten aus der Steigung der beiden Geraden graphisch ermitteln lassen. Diese werden erhalten, wenn die linke Seite der Glchg. II für jeden Zeitpunkt der Kinetik einmal anhand der proteingebundenen RNA des Komplexes und zum anderen anhand der Infektiosität ausgerechnet wird. Dies wurde durchgeführt. Dabei wurde die Anfangskonzentration des Komplexes gemessen als Infektiosität bzw. als proteingebundene RNA pro Lösungsvolumen vor der Salzinkubation, die Restkonzentration des Komplexes als Infektiosität bzw. als proteingebundene RNA, die pro Lösungsvolumen zu jedem Zeitpunkt noch vorhanden war.

Die errechneten Werte sind in Tab. 5 aufgeführt und in Abb. 12 gegen die Zeit aufgetragen.
In beiden Fällen resultierte eine Gerade.

Das bedeutet, die Dissoziation des Komplexes unter hohem Salz ist reaktionskinetisch eine Reaktion 1. Ordnung.

Sowohl aus der Steigung der Geraden der Infektiosität als auch der proteingebundenen RNA wurde für die Geschwindigkeitskonstante k_1 jeweils ein Wert von $0,7 \text{ min.}^{-1}$ graphisch ermittelt. Aus den gleichen Geschwindigkeitskonstanten muß geschlossen werden, daß beide Kurven ein- und denselben Vorgang messen, nämlich die Komplexdissoziation. Dieses Ergebnis zeigt ebenso klar wie die Saccharosegradientenanalyse der gelösten Essigsäureniederschläge, die im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, daß die Infektiosität eine Eigenschaft des Komplexes ist: dissoziiert das A-Protein von der RNA, so verringert sich in dem gleichen Maße die Infektiosität.

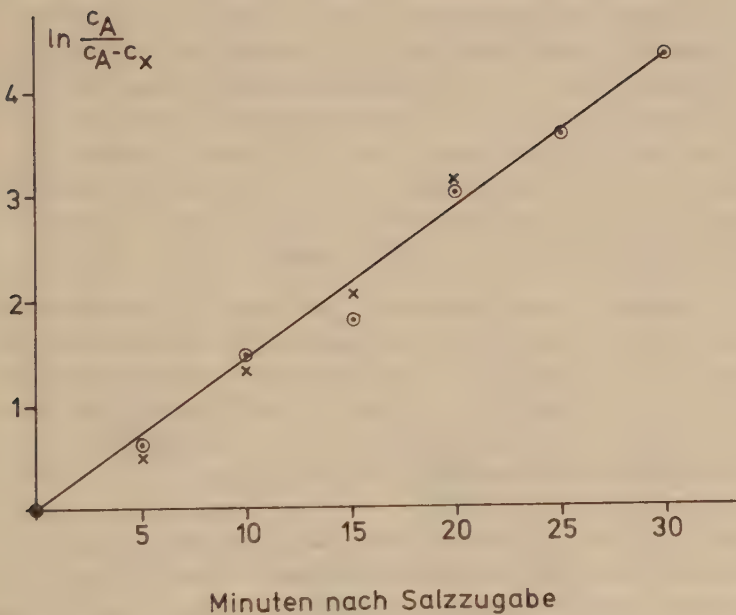


Abb. 12: Der zeitliche Verlauf der Dissoziation des RNA-A-Proteinkomplexes in 0,5 molarem NaCl-Puffer bei 37° C in logarithmischer Darstellung.

c_A = Anfangskonzentration des Komplexes vor der Salzkubation.

$c_A - c_x$ = zu jedem gemessenen Zeitpunkt noch vorhandene Restkonzentration des Komplexes. c_A und $c_A - c_x$ wurden anhand der Infektiosität (○—○) und anhand der proteingebundenen RNA (x—x) gemessen (s. Tab. 5).

- f) Saccharosegradientenanalyse des gelösten Essigsäureniederschlages nach Dissoziation des RNA-A-Proteinkomplexes.

Als nächstes wurde mit Hilfe der Saccharosegradiententechnik untersucht, wie das Protein nach der Komplexdissoziation in der Lösung vorliegt. Dazu wurde ein in Puffer II gelöster Essigsäureniederschlag (isoliert aus $1,2 \times 10^{14}$ Phagen in einer Konzentration von 1,5 mg M12/ml) verwendet, in dem die Proteine mit ^{35}S markiert waren. Von einem Aliquot der Lösung wurde für die gesamte Lösung die Infektiosität zu $1,1 \times 10^6$ Plaques und die ^{35}S -Radioaktivität der Proteine zu $7,57 \times 10^4$ cpm ermittelt. Dann wurde die Lösung durch Zufügen von Puffer III 0,5molar an NaCl gemacht und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend im Saccharosegradienten in Puffer II zentrifugiert. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt.

Hier bandiert der RNA-Gipfel in Fraktion 10. Im Vergleich dazu lagen die RNA-Gipfel von Essigsäureniederschlägen in Puffer II, die nicht mit 0,5 m NaCl-Puffer behandelt wurden, in der Fraktion 15 (s. Abb. 6 und 9). Danach hat die Salzbehandlung die Konformation der RNA geändert, so daß sie schneller sedimentiert. Der in den Abb. 6 und 9 vorhandene Infektiositätsgipfel ist hier kaum noch vorhanden. Die Summe aus der Infektiosität der Fraktionen ergibt 10^4 Plaques. Dies entspricht nur noch ca. 1% der Infektiosität, die die Lösung vor der Salzkubation zeigte. Das ^{35}S -Radioaktivitätsprofil der Proteine zeigt ebenfalls keinen Gipfel mehr an. Die Summe der ^{35}S -Radioaktivität aller Fraktionen beträgt nur noch $2,4 \times 10^3$ cpm. Das sind ca. 3% der Gesamtradioaktivität in der Lösung des Essigsäureniederschlages. Die restliche Proteinradioaktivität findet sich am Gradientenboden wieder.

Offenbar aggregiert das nicht an die RNA gebundene wie das von der RNA durch Salz abgelöste Protein so stark, daß es bei der Gradientenzentrifugation zu Boden sedimentiert.

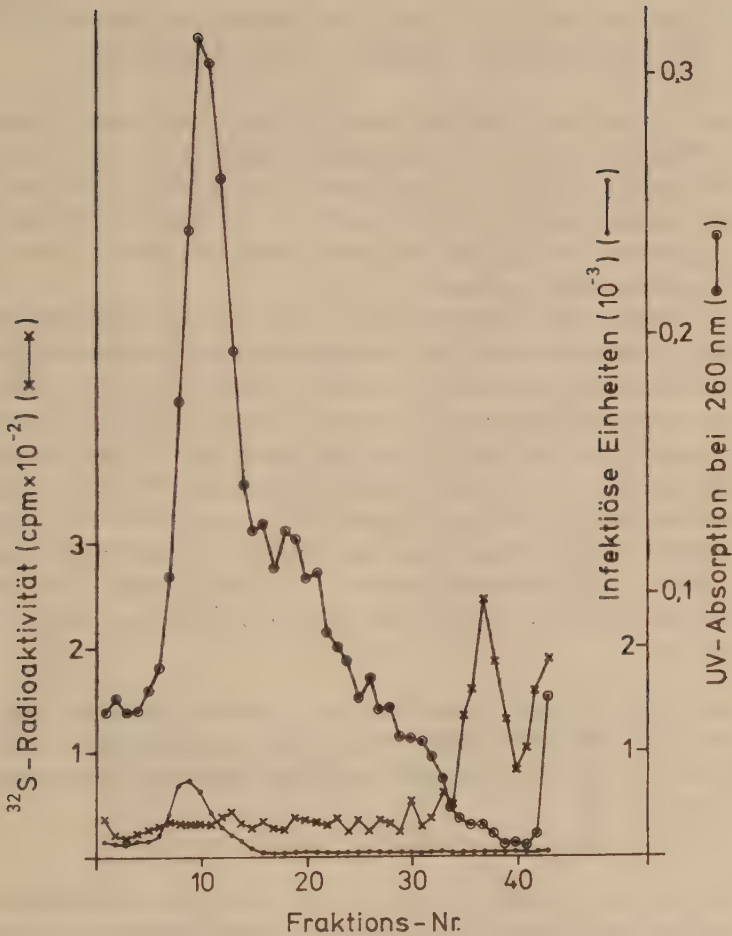


Abb. 13: Verteilung der Infektiosität, der RNA und der Proteine eines gelösten Essigsäureniederschlages nach 30 minütiger Inkubation in einem 0,5molaren NaCl-Puffer bei 37° C in einem Saccharosegradienten (15 - 30% Saccharose in Puffer II, SW 41-Rotor, 20 Stunden bei 35.000 Upm und 0° C). Von den Fraktionen wurde die Infektiosität, die RNA und die ^{35}S -Radioaktivität der Proteine bestimmt wie für die Abb. 9 beschrieben.

- g) Unabhängigkeit der Anzahl der isolierten Komplexmoleküle von verschiedenen Parametern bei der Isolation

Die für die Essigsäurefällungen verwendeten Phagenlösungen variierten, je nachdem aus welcher Präparation sie stammten, in ihrer Konzentration. Es wurde daher getestet, ob verschiedene Phagenkonzentrationen bei der Essigsäurebehandlung einen Einfluß auf die Anzahl der isolierten infektiösen Komplexmoleküle hatten.

Dazu wurden parallel fünf mit ^{32}P -markierte Phagenlösungen aus einer Präparation in unterschiedlichen Konzentrationen mit Essigsäure behandelt. Dabei war die Absolutzahl der eingesetzten Phagen jeweils gleich ($1,43 \times 10^{14}$). Die Konzentration wurde variiert durch Verteilen der Phagen in unterschiedlichen SSC-Puffervolumina. Die Essigsäurefällungen wurden wie im experimentellen Teil beschrieben, bei allen 5 Proben in gleicher Weise durchgeführt. Jeder Essigsäureniederschlag wurde schließlich in 0,25 ml Puffer II gelöst. Die RNA-Konzentration in den Puffer II-Lösungen betrug je 1mg/ml.

Die Zahl der Komplexmoleküle wurde anhand der proteingebundenen RNA im Nirenberg-Filtertest bestimmt. Die Infektiosität der Lösungen wurde mit dem Infektiositätstest ermittelt.

Tabelle 6 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder.

Aus ihr ist ersichtlich, daß die in den Komplexmolekülen vorliegende ^{32}P -Radioaktivität in allen Fällen etwa gleich ist. Ebenso zeigen alle Proben Plaquezahlen in der gleichen Größenordnung.

Innerhalb des gemessenen Bereiches ist also die Zahl der erhaltenen Komplexmoleküle unabhängig von der Konzentration der zur Essigsäurefällung eingesetzten Phagen.

Tabelle 6

SSC-Puffervolumen der M12-Phagen (ml)	M12-Konzentration bei der Essigsäurefällung (mg/ml)	³² P-Markierung in der RNA des Komplexes (cpm)	Infektiosität (pfu's)
0,25	3,50	4,83 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁶
0,50	1,75	4,81 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶
0,75	1,17	4,78 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶
1,00	0,87	4,79 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶
1,50	0,58	4,82 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶

Komplexisolation mit verschiedenen M12-Konzentrationen bei der Essigsäurefällung und konstanten Lösungspuffervolumina. Die Komplexmoleküle werden repräsentiert durch die ³²P-markierte RNA des Komplexes, die im Nirenberg-Filtertest ermittelt wurde. Die Radioaktivität der Komplex-RNA ist bereits korrigiert um den Blindwert, zu dem die phenolextrahierte RNA der Essigsäurefällung im Nirenberg-Test auf Filtern zurückgehalten wird. Die Plaques der Proben wurden im Infektiositätstest gemessen.

Des weiteren wurde die Frage untersucht, ob die Zahl der isolierten Komplexmoleküle abhängig ist von der RNA- und Proteinkonzentration in den gelösten Essigsäureniederschlägen.

Für die Untersuchungen wurden fünf parallele Essigsäurefällungen mit konstanter M12-Konzentration von 1,75 mg/ml mit $1,43 \times 10^{14}$ ^{32}P -markierten M12-Phagen durchgeführt. Die fünf Essigsäureniederschläge wurden jeweils in unterschiedlichen Volumina von Puffer II gelöst, so daß die Konzentration der RNA und des A-Proteins in den Lösungen variierte. Unmittelbar danach wurde die Zahl der in den Lösungen vorhandenen Komplexmoleküle und die jeweilige Infektiosität bestimmt.

Tabelle 7 faßt die experimentellen Daten und die gewonnenen Ergebnisse zusammen. Diese zeigen, daß sich unabhängig vom Volumen des Puffers, in dem die Essigsäureniederschläge gelöst werden, in allen Proben stets gleich viele Komplexmoleküle befinden. Ebenso werden in allen Proben gleiche Plaquezahlen erhalten.

Alle Werte waren unverändert nach mehrstündigem Stehen im Eisbad. Nach diesen Befunden ist die Zahl der isolierten infektiösen Komplexmoleküle unabhängig von der RNA- und A-Proteinkonzentration in der Lösung.

Dieses Resultat kann in verschiedener Weise interpretiert werden.

Nimmt man an, daß sich die Komplexmoleküle nach dem Auflösen der Essigsäureniederschläge aus RNA und A-Protein bilden, so ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung proportional den Konzentrationen der Reaktionspartner. Man sollte dann eine Abhängigkeit der Zahl der isolierten Komplexmoleküle von der RNA- und A-Proteinkonzentration finden. Daß dies nicht gefunden wurde, kann

nun bedeuten, daß die Komplexbildung so schnell abläuft, daß die verschiedenen Konzentrationen der Reaktionspartner keinen meßbaren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben. Es kann jedoch auch besagen, daß keine Komplexmoleküle entstehen. Dann müssen sie jedoch bereits in den Phagen vorgelegen haben. Daß dies der Fall ist, zeigen Versuchsergebnisse, die im dritten Teil der Arbeit dargestellt sind (s. S. 97).

Tabelle 7

Puffer II-Volumen (ml)	RNA-Konzentration in der Puffer II- Lösung (mg/ml)	³² P-Markierung in der RNA des Komplexes (cpm)	Infektiosität (pfu's)
0,25	1,00	4,79 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶
0,50	0,50	4,77 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶
0,75	0,34	4,82 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶
1,00	0,25	4,84 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶
1,50	0,17	4,85 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶

Komplexisolation mit verschiedenen Volumina des Lösungspuffers II für die Essigsäure-
derschläge und mit konstanten M12-Konzentrationen bei den Essigsäurefällungen. Die Kom-
plexmoleküle sind repräsentiert durch die ³²P-markierte RNA des Komplexes, die im Niren-
berg-Filtertest ermittelt wurde. Die Radioaktivität der Komplex-RNA ist bereits korrigiert
um den Wert, zu dem die phenolextrahierte RNA der Essigsäurefällung im Nirenberg-Test auf
Filtern zurückgehalten wird. Die Plaques der Proben wurden im Infektiositätstest gemessen.

h) Untersuchungen über die Infektiosität des RNA-A-Proteinkomplexes gegenüber E.coli-Wirtszellen.

1. Infektion der Bakterien mit dem Komplex via F-Pili

Es wurde die Frage untersucht, auf welchem Wege der RNA-A-Proteinkomplex die Wirtszellen infiziert. Ganze RNA-Phagen können sich nur auf E.coli F^+ - oder Hfr-Stämmen vermehren. Diese Stämme tragen in ihrem genetischen Material den F-Faktor (Fertilitätsfaktor), der für die Ausbildung der F-Pili verantwortlich ist.

Die F-Pili stammen von der Zellmembran und sind aus Protein zusammengesetzt. Sie durchdringen die Bakterienzellwand und ragen als stäbchenförmige Zellorganellen aus der Bakterienoberfläche hervor.

Die Infektion dieser Zellen mit RNA-Phagen erfolgt ausschließlich über die F-Pili, an die die Phagen als ersten Schritt adsorbieren und durch die sie dann ihre RNA in die Zelle injizieren (Brinton, 1965, Valentine u. Mitarb. 1969). Zellen, die keine F-Pili tragen, können nicht von RNA-Phagen infiziert werden.

Es wurde nun untersucht, ob der isolierte RNA-A-Proteinkomplex in gleicher Weise wie der ganze Phage M12 die E.coli-Wirtszellen via F-Pili infizierte. Dazu wurde die Infektiosität des Komplexes auf Bakterien mit F-Pili mit der auf Bakterien nach Abscheren der F-Pili verglichen.

Hierbei mußte jedoch folgendes beachtet werden:

Geschorene Zellen regenerieren ihre F-Pili sehr schnell bei $37^{\circ}C$ (Novotny u. Mitarb. 1969 a und 1969 b). Würden diese geschorenen Zellen bei $37^{\circ}C$ mit dem Komplex infiziert, so würden genauso viele Zellen infiziert wie vor dem Abscheren der F-Pili, da diese während der Infektion nachgewachsen wären.

Dieses störende Nachwachsen der F-Pili von geschorenen Zellen ist jedoch gering bei niedriger Temperatur. Inkubiert man daher geschorene sowie ungeschorene Kontrollzellen bei 0°C mit dem Komplex, so werden nur sehr wenige F-Pili an den geschorenen Zellen bei dieser Temperatur nachwachsen, und demzufolge werden die Komplexmoleküle nur an die F-Pili der ungeschorenen Zellen adsorbieren können.

Nach Abzentrifugieren nicht adsorbierter Komplexmoleküle in den Überstand und Temperaturerhöhung auf 37°C können dann nur die an die F-Pili der ungeschorenen, resuspendierten Zellen adsorbierten Komplexmoleküle die Zellen infizieren.

Für die Experimente wurde eine Übernachtskultur des E.coli-Stammes AB301 (Hfr-Stamm) mit einem Titer von 2×10^9 Zellen/ml in M3-Medium verwendet. Die Kultur wurde halbiert. Von den Zellen der einen Kulturhälfte wurden die F-Pili nicht abgeschoren. Sie dienten als Kontrolle, um die Infektiosität des Komplexes auf Zellen mit F-Pili festzulegen. Die gewaschenen Zellen wurden bei 0°C für 3 Minuten mit dem Komplex, der aus $1,2 \times 10^{13}$ infektiösen M12 isoliert worden war, inkubiert. Bei 0°C sollten die Komplexmoleküle an die Oberflächen der F-Pili adsorbieren analog wie die ganzen M12-Phagen, jedoch nicht infizieren. Die Komplexmoleküle, die innerhalb dieser 3 Minuten noch nicht adsorbiert waren, wurden bei 5.000Upm für 7 Minuten bei 0°C durch Zentrifugieren in den Überstand abgetrennt. Die Zellen mit den adsorbierten Komplexmolekülen wurden im Ausgangsvolumen mit frischem M3-Medium wieder aufgenommen und dann für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die adsorbierten Komplexmoleküle die Zellen infizieren konnten. Danach wurde mit 5 ml 45°C warmen CW-Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten (5 Parallelproben) im 37°C -Brut-

schrank über Nacht wurden 6×10^5 Plaques erhalten.

Im Vergleich dazu wurden im Infektiositätstest, wo die gewaschenen Zellen für 10 Minuten bei 37°C mit dem Komplex inkubiert und dann sofort ausplattiert wurden, $1,15 \times 10^6$ Plaques erhalten.

Von der anderen Hälfte der Kultur wurden die F-Pili mit dem Ultrathorax abgeschoren (s. ET, S.121). Nach dem Waschen wurden die geschorenen Zellen im ursprünglichen Volumen M3-Medium bei 0°C aufgenommen und für 3 Minuten bei 0°C mit dem Komplex inkubiert. Falls hierbei die Adsorption der Komplexmoleküle nur über die F-Pili erfolgte, sollten bei den geschorenen Zellen während dieser 3 Minuten der Adsorptionsphase keine Komplexmoleküle an die Zellen adsorbieren. Nach dem Abzentrifugieren der nicht adsorbierten Komplexmoleküle wurden die geschorenen Zellen im Ausgangsvolumen in M3-Medium aufgenommen und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei regenerieren die F-Pili, aber es sind keine adsorbierten Komplexmoleküle vorhanden, die jetzt die Zellen infizieren könnten. Dann wurde ausplattiert (5 Parallelproben). Die Platten zeigten nach Inkubation im Brutschrank 10^5 Plaques.

Als Kontrolle, daß die Bakterien durch das Abscheren ihrer F-Pili nicht geschädigt und in ihrer Infizierbarkeit beeinträchtigt worden waren, wurde ein Teil der geschorenen Zellen für 10 Min. bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit sollten die Zellen ihre F-Pili regeneriert haben und im gleichen Ausmaße infizierbar sein, wie vor dem Scheren, falls keine sonstigen Schädigungen der Zellen eingetreten wären. Diese Zellen wurden dann in gleicher Weise wie vor dem Abscheren ihrer F-Pili mit dem Komplex infiziert. Im Infektiositätstest wurden dabei $1,35 \times 10^6$ Plaques gezählt, in dem Test, wo der Komplex erst bei 0°C adsorbierte und dann bei 37°C infizierte, 7×10^5 Plaques.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1) Im Infektiositätstest, in dem die Bakterien bei 37°C für 10 Minuten mit dem Komplex inkubiert wurden, werden ca. doppelt so viele Plaques erhalten wie bei der zweistufigen Infektion, bei welcher erst Adsorption bei 0°C und dann Infektion bei 37°C erfolgt. Dieses Ergebnis wird verständlich, da offenbar analog zu ganzen Phagen bei 0°C in 3 Minuten noch nicht alle Komplexmoleküle adsorbiert haben, so daß eine verminderte Zahl an adsorbierten Komplexmolekülen dann bei 37°C infiziert.

2) Unter gleichen Infektionsbedingungen zeigen die Zellen nach Abscheren ihrer F-Pili nur noch 16% der Plaques, die auf ungeschorenen Zellen erhalten wurden. Das beweist, daß von diesen Zellen weniger infiziert wurden. Aus dieser deutlich verminderten Infektiosität des Komplexes auf geschorenen Zellen ohne F-Pili kann geschlossen werden, daß der Komplex die Zellen via F-Pili infiziert, wie dies ganze RNA-Phagen auch tun. Theoretisch sollte, wenn über die F-Pili infiziert wird, und durch Abscheren alle F-Pili entfernt wurden, überhaupt keine Infektiosität des Komplexes mehr gefunden werden. Die beobachtete restliche Infektiosität von 16% läßt sich jedoch dadurch erklären, daß die F-Pili auch bei 0°C teilweise nachgebildet werden, so daß zum Zeitpunkt der Infektion sicherlich ein Teil der Zellen neugebildete F-Pili besitzt, durch die der Komplex die Zellen infizieren kann.

3) Gibt man den geschorenen Zellen Zeit, ihre F-Pili zu regenerieren und infiziert sie dann mit dem Komplex, so werden genausoviele Zellen infiziert wie vor dem Abscheren der F-Pili. Dies zeigt deutlich, daß die Zellen durch das Scheren in ihrer Infizierbarkeit nicht geschädigt wurden. Demnach kommt die erhaltene verminderte Plaquezahl nach Infektion der geschorenen Zellen nur dadurch zustande, daß

die zur Infektion nötigen F-Pili fehlen.

Mit dem F⁻-Stamm E. coli B läßt sich ebenfalls demonstrieren, daß der RNA-A-Proteinkomplex die Bakterien via F-Pili infiziert. So sind keine Plaques nachweisbar, wenn Bakterien dieses Stammes mit den gelösten Essigsäureniederschlägen unter den gleichen Bedingungen wie E. coli AB301 infiziert wurden.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß der aus dem Phagen M12 isolierte RNA-A-Proteinkomplex die E. coli-Wirtszellen via F-Pili infiziert wie der ganze Phage.

2. Penetration des RNA-A-Proteinkomplexes in die Bakterienzellen

Die vorausgegangenen Experimente zeigten, daß der RNA-A-Proteinkomplex intakte E.coli-Bakterienzellen über ihre F-Pili infiziert und infektiöse Nachkommenphagen in den Zellen erzeugt, d.h., daß er infektiös ist.

Theoretisch sollte daher jedes vorhandene Komplexmolekül im Infektiositätstest einen Plaque erzeugen.

Beobachtet wurde aber nur eine Infektiositätsausbeute von ca. 10^{-7} Plaques/Komplexmolekül. Es war daher anzunehmen, daß einer der beiden oder beide Teilschritte, die zu einer virulenten Infektion notwendig sind, nämlich erstens die Penetration der Komplexmoleküle in die Zellen und zweitens die Phagenvermehrung in den Zellen, inhibiert war. Es wurde daher als erstes die Möglichkeit der gehinderten Penetration untersucht.

Dazu wurden 5 ml gewaschene Bakterien aus einer Übernachtskultur des Stammes AB301 unter den Bedingungen des Infektiositätstestes mit 0,05 ml der Lösung eines Essigsäureniederschlages für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNA des Komplexes in der Lösung war mit $7,4 \times 10^5$ ^{32}P -cpm markiert (ermittelt im Nirenberg-Filtertest). In dieser Zeit sollten alle Komplexmoleküle in die Zellen penetriert sein. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, mit frischem Medium gewaschen und erneut in 5 ml Medium (M3) aufgenommen.

Zum Entfernen von unspezifisch adsorbierter extrazellulärer RNA wurden die Zellen dann für 30 Minuten bei 37°C mit pankreatischer RNase (50 γ /ml) inkubiert. Danach wurden sie abzentrifugiert, erneut gewaschen und in 3ml Medium aufgenommen. Aliquots der resuspendierten Zellen wurden auf Papierfilter getropft, deren ^{32}P -Radioaktivität nach dem Trocknen

gezählt wurde. Dabei wurde keine ^{32}P -Radioaktivität mit den Zellen assoziiert gefunden.

Das bedeutete, daß keine meßbaren Mengen Komplexmoleküle in die Zellen penetriert waren.

Die Penetration der Komplexmoleküle war also offensichtlich inhibiert.

Nimmt man an, daß nur jedes 10^{-7} Komplexmolekül in die Zellen penetrierte, so erklärt sich die Infektiositätsausbeute von 10^{-7} Plaques/Komplexmolekül allein durch eine gehemmte Penetration. Diese Annahme konnte jedoch nicht experimentell überprüft werden, da die ^{32}P -Radioaktivität der gesamten Komplex-RNA-Moleküle nur $7,4 \times 10^5$ cpm betrug.

Die experimentellen Resultate schließen es also nicht aus, daß mehr als nur jedes 10^{-7} Komplexmolekül in die Zellen gelangte. Wenn dies zuträfe, sind die Infektiositätsausbeuten von 10^{-7} Plaques/Komplexmolekül nur durch die Annahme erklärbar, daß außer der Penetration der Komplexmoleküle in die Zellen noch die Phagenvermehrung in den Zellen gehemmt ist.

Die Phagenvermehrung in den Zellen nach Infektion mit den ^{32}P -markierten Komplexmolekülen zu untersuchen, erübrigte sich jedoch, da keine meßbaren Mengen an Komplexmolekülen in die Zellen penetriert waren.

3. Untersuchungen über Faktoren, welche die Infektiosität des RNA-A-Proteinkomplexes beeinflussen.

Wie berichtet, wurden mit dem RNA-A-Proteinkomplex Infektiositätsausbeuten von ca. 10^{-7} Plaques/Komplexmolekül auf intakten E.coli-Zellen erreicht.

Die geringen Infektiositätsausbeuten könnten verursacht sein:

- I. durch Denaturierung des Komplexes bei seiner Isolation,
- II. durch chemische Modifikation der RNA bei der Essigsäurebehandlung der Phagen.

zu I. Die Annahme, daß der Komplex durch Denaturierung bei seiner Isolierung biologisch inaktiviert wird, konnte durch Experimente mit hochmolarem Harnstoffpuffer unterstützt werden.

Diesen Experimenten lag der Gedanke zugrunde, die Sekundärstruktur des Komplexes durch eine kurze Einwirkung von hochmolarem Harnstoffpuffer aufzufalten, d.h., Bereiche des Komplexes, die beim Ausfällen mit Essigsäure in räumliche Nachbarschaft kamen und beim Lösen des Komplexes in Puffer II durch Wasserstoffbrückenbindungen vernetzt blieben, zu trennen. Die aufgefalteten Komplexmoleküle sollten sich danach beim Verdünnen in einen Puffer ohne Harnstoff (Puffer II) leichter in ihre native Struktur zurückfalten, woraus eine erhöhte biologische Aktivität=Infektiosität des Komplexes resultieren sollte.

Zu diesem Zwecke wurden aus $1,4 \times 10^{14}$ ^{32}P -markierten Phagen (Konzentration: 1,75 mg M12/ml) parallel zwei Essigsäureniederschläge isoliert (s. ET, S.115).

Ein Essigsäureniederschlag wurde wie bisher für 5 Minuten bei 37°C in Puffer II gelöst, der zweite im gleichen Volumen eines 8 m Harnstoffpuffers (s. ET, S.106) für 3 Minuten bei 37°C . (In 6m Harnstoffpuffer war der Essigsäureniederschlag nicht löslich.)

Die Anzahl der vorhandenen Komplexmoleküle und die Infektiosität der beiden Lösungen wurde nun verglichen. Die Zahl der Komplexmoleküle in beiden Lösungen wurde unmittelbar nach dem Lösen anhand der proteingebundenen RNA des Komplexes mit dem Nirenberg-Filtertest gemessen (s. S.125), da anzunehmen war, daß sich das A-Protein von der RNA des Komplexes unter hohem Harnstoff bei längerem Stehen löst. Der Nirenberg-Test ergab für die proteingebundene RNA in der Harnstofflösung 80% der proteingebundenen RNA in der Puffer II-Lösung. (Die Werte für die proteingebundene RNA des Komplexes waren korrigiert um den Prozentsatz, zu dem mit Phenol aus den Essigsäureniederschlägen extrahierte RNA nach Lösen in Puffer II bzw. 8m Harnstoffpuffer im Nirenberg-Test auf dem Filter zurückgehalten wurden.) Ließ man die Lösung in dem 8m Harnstoffpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) stehen, so wurde im Nirenberg-Test keine proteingebundene RNA mehr entdeckt.

Ebenfalls unmittelbar nach dem Lösen wurden Aliquots aus beiden Lösungen jeweils in eiskalten Puffer II hineinverdünnt und auf Infektiosität auf intakten E.coli-Zellen (s. ET, S.120) getestet. Als Ergebnis wurden für die Lösungen in Puffer II und in 8m Harnstoffpuffer Infektiositätsausbeuten von ca. 10^{-7} bzw. 2×10^{-6} Plaques/Komplexmolekül erhalten. Längeres Stehen verminderte die Infektiosität der Lösung im 8m Harnstoffpuffer beträchtlich: nach 1 Stunde bei Raumtemperatur (20°C) waren noch 5%, nach 30 Minuten bei 37°C noch 2% nachweisbar.

Die gegenüber der Lösung in Puffer II um den Faktor 20 gesteigerte Infektiositätsausbeute, welche die Komplexmoleküle in 8m Harnstoffpuffer ergeben, demonstrieren deutlich den Einfluß der Konformation dieser Moleküle auf ihre Infektiosität. Danach verändert offenbar eine kurze Einwirkung des Harnstoffs auf die Komplexmoleküle deren Konformation in einer für die Infektiosität günstigen Weise,

während bei längerer Einwirkung das A-Protein von der RNA gelöst wird, wodurch die Infektiosität verlorengeht.

zu II. Wie schon aus den Saccharosegradientenanalysen hervorging, lag stets ein Teil der RNA in den gelösten Essigsäureniederschlägen in degradiert Form vor, der nur durch saure Hydrolyse bei der Essigsäurebehandlung der Phagen entstanden sein konnte.

Die Frage war nun, ob die Essigsäurebehandlung außer der Hydrolyse noch eine chemische Modifikation der RNA-Moleküle bewirkte und hierdurch ihre biologische Aktivität verringerte.

Dies war mit einem empfindlichen Test auf eine biologische Eigenschaft der RNA zu prüfen. Dazu bot sich der Sphäroplastentest an. In diesem Test wird die Infektiosität isolierter Phagennukleinsäure auf Bakterien getestet, deren formgebendes Mucopolymer der Zellwand durch Lysozymbehandlung in hochprozentiger Saccharoselösung abgebaut ist, so daß sich die langgestreckten Zellen in kugelige Sphäroplasten umwandeln. Diese lassen sich dann im Gegensatz zu Bakterienzellen mit kompletter Zellwand, von isolierter Phagennukleinsäure infizieren (Hofschneider, 1960, Guthrie u. Sinsheimer, 1960, Wahl, Huppert u. Emerique-Blum, 1960, Sekiguchi, Taketo u. Takagi, 1960, Davis, Strauss u. Sinsheimer, 1961, Hofschneider 1963).

Im Sphäroplastentest wurde die Infektiosität der RNA aus den ganzen Phagen mit der einer äquivalenten RNA-Menge aus einem Essigsäureniederschlag verglichen. Beide RNA-Proben waren mit Phenol aus den Phagen bzw. aus einem Essigsäureniederschlag isoliert worden (s. ET, S. 119). Der Sphäroplastentest wurde nach Francke und Hofschneider mit dem E.coli-Stamm AB301 ausgeführt (s. ET, S.121). Die Kompetenz der verwendeten Sphäroplasten betrug 5×10^{-7} Plaques/

Phagenäquivalent. Im Sphäroplastentest war die RNA aus dem Essigsäureniederschlag um den Faktor 10 weniger infektiös als die aus den Phagen isolierte.

Demnach sind offenbar ca. 90% der gesamten RNA bei der Essigsäurebehandlung der Phagen biologisch inaktiviert worden. Diese Inaktivierung dürfte größtenteils wenn nicht gar vollständig durch die stattgefundene Hydrolyse hervorgerufen sein. Dabei ist die Entscheidung, ob außer der Hydrolyse zusätzlich biologische Inaktivierung durch chemische Modifikation der RNA-Moleküle stattfand, nur zu treffen, wenn das Hydrolyseausmaß bekannt ist. Letzteres konnte jedoch aus den Sedimentationseigenschaften der RNA eines gelösten Essigsäureniederschlages im Saccharosegradienten nicht genau sondern nur überschlagsmäßig zu 80 - 90% kalkuliert werden wegen der Überlagerung von intakter und hydrolysiert RNA (s. S. 27). Nimmt man erstens an, daß 90% der RNA hydrolysiert vorliegen, so signalisiert das Ergebnis des Sphäroplastentestes, daß außer der Hydrolyse keine anderweitige biologische Inaktivierung der RNA durch chemische Modifikation stattfand. Die restlichen 10% intakter RNA-Moleküle riefen dann die Infektiosität im Sphäroplastentest hervor.

Unter der zweiten Annahme, daß 80% der RNA nach der Essigsäurebehandlung der Phagen hydrolysiert vorliegen, existieren doppelt so viel intakte wie infektiöse RNA-Moleküle in einem Essigsäureniederschlag, was einer biologischen Inaktivierung der RNA durch chemische Modifikation um den Faktor 2 entspricht.

Nach dieser Kalkulation kann also chemische Modifikation der RNA-Moleküle des Komplexes nur einen unbedeutenden Beitrag zur Infektiositätsverminderung des Komplexes auf intakten Wirtszellen leisten.

Diskussion

Die Frage nach der Existenz eines RNA-A-Proteinkomplexes im RNA-Phagen M12 wurde hier angegangen mit dem Versuch, einen solchen Komplex direkt aus hochgereinigten M12-Phagen zu isolieren.

Dabei war eine kurze Behandlung der Phagen mit 66%iger Essigsäure in der Kälte die Methode der Wahl, da durch ihre Anwendung mit einem einzigen Schritt der große Coatproteinüberschuß, der in den Phagen gegenüber dem A-Protein herrscht, von der RNA und dem A-Protein spezifisch abgetrennt werden konnte. Hierbei wurde die RNA gemeinsam mit dem A-Protein im Essigsäureniederschlag erhalten, während das Coatprotein zu mehr als 99% im Überstand verblieb.

Die weiteren Untersuchungen zielten auf den Nachweis des RNA-A-Proteinkomplexes in den Essigsäureniederschlägen. Dabei bestand zunächst die Schwierigkeit, die Niederschläge in einem Puffer zu lösen, der eine vorhandene RNA-A-Proteinbindung nicht dissoziierte.

Durch Austesten einer ganzen Reihe von Puffern (s. Tab. 1) ohne SDS wurde schließlich Puffer II als geeigneter Lösungspuffer für den Essigsäureniederschlag von M12 ermittelt, in dem das EDTA die Komponente war, die das Lösen ermöglichte. Er wurde daher als Lösungspuffer für die weiteren Untersuchungen benutzt.

Mit dem erfolgreichen Lösen der Essigsäureniederschläge in Puffer II war erst die Voraussetzung für alle weiteren Experimente geschaffen.

Die ersten Untersuchungen sollten klären, ob sich restliche infektiöse Phagen in den gelösten Essigsäureniederschlägen befanden, welche die Essigsäurebehandlung überlebt hatten. Die deshalb durchgeführten Plaqueteste zeigten infektiöse

Partikel an. Daß es sich bei diesen jedoch nicht um intakte Phagen handeln konnte, ergab sich aus der RNase-Sensitivität ihrer Infektiosität.

Dieses Ergebnis war überraschend, da bis dahin von vorhandener Infektiosität in einer Lösung stets auf die Gegenwart von Phagen zurückgeschlossen wurde. Auf der Suche nach dem infektiösen Agens in den gelösten Essigsäureniederschlägen erwies sich die aus den Essigsäureniederschlägen isolierte RNA als nicht infektiös auf ganzen Bakterien. Dieser Befund ist in voller Übereinstimmung mit den Literaturangaben, wonach isolierte Phagennukleinsäuren ihre Wirtszellen erst nach Abbau des Mucopolymergerüsts der Zellwand zu infizieren vermögen.

Getestete Mischungen aus RNA und Coatprotein, das in geringen Mengen in den Essigsäureniederschlägen vorkommt, waren ebenfalls nicht infektiös auf ganzen E.coli-Zellen (s. Tab. 2).

Dies ist im Einklang mit früheren genetischen Daten, wonach RNA-Phagen, die durch Wachsen von A-Cistronambermutanten in nicht permissiven Wirten gebildet werden, nicht infektiös sind (Lodish u. Mitarb., 1965, Heisenberg u. Blessing, 1965, Heisenberg, 1967), und mit in vitro-Daten, die eine erfolgreiche in vitro-Rekonstitution infektiöser Phagen nur in Gegenwart von A-Protein gelingen ließen (Roberts und Steitz, 1967, Hung und Overby, 1969, Herrmann, 1970).

Nach diesen Ergebnissen kann also ausgeschlossen werden, daß die RNA oder die RNA zusammen mit dem Coatprotein die Infektiosität in den gelösten Essigsäureniederschlägen verursacht.

Demnach konnte die vorhandene Infektiosität nur an die Gegenwart des A-Proteins und der RNA geknüpft sein, die hier aber nicht im ganzen Phagen vorlagen, sondern offenbar in Form eines bisher unbekannten infektiösen Partikels.

Damit war zu der ursprünglichen Frage nach der Existenz eines RNA-A-Proteinkomplexes im Phagen M12 die Frage nach der Natur des infektiösen Agens in den gelösten Essigsäureniederschlägen hinzugekommen.

Die eingehendere Analyse der gelösten Essigsäureniederschläge im Saccharosegradienten brachte dann die Lösung beider Fragen.

Sie zeigt klar, daß ein RNA-A-Proteinkomplex vorliegt. Dies muß aus den koinzidierenden Gipfeln des selektiv mit ^3H -Histidin-markierten A-Proteins und der proteingebundenen RNA geschlossen werden.

Das kalkulierte Molekülverhältnis zwischen der RNA und dem A-Protein des Komplexes beträgt 1:1. Ferner klärt der Saccharosegradient in eindeutiger Weise die Frage nach dem infektiösen Agens. Es erweist sich, daß der RNA-A-Proteinkomplex die Infektiosität in den gelösten Essigsäureniederschlägen verursacht. Dies folgt daraus, daß der Infektiositätsgipfel stets mit dem RNA-A-Proteinkomplekgipfel zusammenfällt.

Damit ist wie durch die vorhergehenden Versuchsergebnisse schon gezeigt wurde, bestätigt, daß die Infektiosität nicht von restlichen ganzen Phagen, sondern von einem RNA-A-Proteinkomplex hervorgerufen wird.

Quantitativ gesehen, ergab die Saccharosegradientenanalyse, daß nur etwa 10% der RNA und ein Teil des A-Proteins als RNA-A-Proteinkomplex in den gelösten Essigsäureniederschlägen vorliegen.

Das nicht im Komplex gebundene A-Protein liegt dagegen in Form von Aggregaten vor, die über den ganzen Gradienten verteilt bandieren und sich zum Teil am Boden des Gradientenröhrchens wiederfinden. Auch das Coatprotein kommt in

Aggregaten vor. Dies stimmt überein mit Literaturberichten, wonach Strukturproteine von RNA-Phagen in Puffern ohne denaturierende Agenzien als Aggregate vorliegen (Argetsinger-Steitz, 1968 b).

Der größte Teil der nicht im Komplex gebundenen RNA-Moleküle liegt in degradiert Form vor, was aus dem heterogenen RNA-Profil geschlossen werden muß. Diese degradierte RNA kann nur bei der Essigsäurebehandlung der Phagen durch saure Hydrolyse entstanden sein. Offensichtlich laufen, nachdem die Coatproteinhülle der Phagen durch die Einwirkung der Essigsäure entfernt ist, die saure Hydrolyse und die Präzipitation der RNA als Konkurrenzreaktionen ab. Obwohl die letztere Reaktion sichtbar unmittelbar nach Mischen der Phagen mit der Essigsäure erfolgt, scheint es eine kurze Zeitspanne vor dem Ausfallen der RNA zu geben, in der eine partielle Hydrolyse möglich ist.

Das Profil der proteingebundenen RNA unterscheidet sich völlig von dem der Gesamt-RNA. Es weist nur einen scharfen Gipfel in der Position intakter RNA-Moleküle auf, dagegen keine im Bereich degradiert RNA-Moleküle, wie sie im Profil der Gesamt-RNA auftreten. Ein geringer Anteil der proteingebundenen RNA, 10 - 20%, bandierte am Gradientenmeniskus.

Welche Schlußfolgerungen sich aus den unterschiedlichen Profilen der Gesamt- und der Komplex-RNA ziehen lassen, wird auf S.77 noch diskutiert werden.

In den weiteren Untersuchungen wurde die Bindung zwischen der RNA und dem A-Protein analysiert. Die Dissoziation des Komplexes unter hoher Salzkonzentration bei 37° C offenbarte eine ionische Bindung, die allerdings bei 0° C erhalten blieb. Daraus kann abgeleitet werden, daß es sich um eine starke ionische Bindung handelt, die erst nach Zu-

führung von Aktivierungsenergie in Form von Wärme gelöst wird. Die Ablösung des Proteins von der RNA beim Stehen des Komplexes in hochmolarem Harnstoffpuffer zeigt, daß auch Wasserstoffbrückenbindungen eine Rolle bei der RNA-Proteinwechselwirkung spielen. Das durch hohes Salz von der RNA abgelöste A-Protein liegt in hoch aggregierter Form vor (s.S. 50), so daß die Rückreaktion - die Komplexbildung aus RNA und A-Protein - nicht stattfinden kann.

Weitere wichtige Erkenntnisse lieferte die Messung der Kinetik der Komplexdissoziation.

Diese wurde verfolgt durch die Abnahme der proteingebundenen RNA mit der Zeit. Als Ergebnis wurde gefunden, daß die Komplexdissoziation eine Reaktion 1. Ordnung ist, deren Geschwindigkeitskonstante in einfacher Weise bestimmt werden konnte. Durch die zusätzliche Messung der Kinetik der Abnahme der Infektiosität wurde in noch eindeutigerer Weise als im Saccharosegradienten der Zusammenhang zwischen dem RNA-A-Proteinkomplex und der Infektiosität demonstriert. So verlief auch die Abnahme der Infektiosität mit der Zeit in einer Reaktion 1. Ordnung und zwar mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante wie sie für die Komplexdissoziation erhalten wurde. Diese Gleichheit der Geschwindigkeitskonstanten zeigt klar, daß die Infektiosität eine Eigenschaft des RNA-A-Proteinkomplexes ist. Sie liefert außerdem noch einen starken Hinweis darauf, daß in den gelösten Essigsäureniederschlägen kein RNA-Coatproteinkomplex existiert, dessen Existenz nach den Ergebnissen der Saccharosegradientenanalyse allein nicht ausgeschlossen werden konnte (vgl. S.40).

Wenn ein solcher Komplex neben dem RNA-A-Proteinkomplex vorläge, so stellte die gemessene Kurve für die Komplexdissoziation eine Überlagerung aus den Dissoziationskurven für den RNA-A- und für den RNA-Coatproteinkomplex dar. Die

Tatsache, daß aus der Überlagerung zweier Dissoziationsprozesse die gleiche Geschwindigkeitskonstante resultiert wie bei der Abnahme der Infektiosität, die nur die Ablösung des A-Proteins von der RNA mißt, wäre dann nur unter der Annahme erklärlich, daß sowohl der RNA-A-Proteinkomplex als auch der RNA-Coatproteinkomplex mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante dissoziiert. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich.

Die quantitative Auswertung der Komplexdissoziation liefert also eine starke Evidenz für das alleinige Vorliegen eines RNA-A-Proteinkomplexes in den gelösten Essigsäureniederschlägen, so daß der RNA-A-Proteinkomplex durch die proteingebundene RNA gemessen werden kann.

Die folgenden Untersuchungen betrachteten die Eigenschaft des RNA-A-Proteinkomplexes, intakte E.coli-Wirtszellen zu infizieren und in ihnen reife Nachkommenphagen zu erzeugen, also seine Infektiosität. Dabei zeigte sich, daß der Komplex genau wie der ganze Phage die Wirtszellen via F-Pili infiziert. Die Komplexmoleküle waren allerdings wesentlich weniger infektiös als ihre Ausgangsphagen. So erzeugte im Infektiositätstest nur ca. jedes 10^{-7} Komplexmolekül einen Plaque.

Der hauptsächlichliche Grund hierfür dürfte sein, daß die Moleküle bei ihrer Isolation stets so stark denaturiert werden, daß sie ihre biologische Aktivität verlieren. Dabei dürfte sich die Denaturierung der RNA und des A-Proteins im Hinblick auf eine Verringerung der Infektiosität des Komplexes multiplikativ verstärken. Der Einfluß der Denaturierung auf die Infektiosität der Komplexmoleküle konnte durch Experimente demonstriert werden, in denen die Komplexmoleküle in hochmolarem Harnstoffpuffer inkubiert wurden, um ihre Konformation zu ändern. Daraus resultierte eine ca. um den Faktor 20 gesteigerte Infektiositätsausbeute, die sich damit von 10^{-7} auf 2×10^{-6} Plaques/Komplexmolekül erhöhte.

Als Folge der Denaturierung kann die beobachtete inhibierte Penetration der Komplexmoleküle in die Zellen angesehen werden. Es ist anzunehmen, daß besonders die Denaturierung des A-Proteins in den Komplexmolekülen dabei eine Rolle spielt. Im ganzen Phagen ermöglicht das A-Protein die Adsorption der Phagen an die F-Pili der Bakterienzellen als ersten Teilschritt der Infektion.

Es ist daher in Analogie zu den ganzen Phagen denkbar, daß das denaturierte A-Protein im RNA-A-Proteinkomplex seine Funktion bei der Wechselwirkung der Komplexmoleküle mit den F-Pili der Zellen nicht mehr erfüllen kann, so daß diese nicht in die Zellen eindringen.

Ein weiterer möglicher Grund für eine verminderte Infektiosität der Komplexmoleküle ist eine biologische Inaktivierung bei der Inkubation mit den Wirtszellen. Dies wird durch den Tatbestand angedeutet, daß bereits einmaliges Waschen der Zellen die Infektiosität der Komplexmoleküle rund um den Faktor 10 steigert. Möglicherweise sind auch nach dem Waschen noch Restaktivitäten von RNase an die Bakterienzellen assoziiert, welche die RNA der infizierenden Komplexmoleküle, die nicht wie in den ganzen Phagen vom Coatprotein geschützt vorliegt, verdauen. Schließlich ist festzuhalten, daß durch eine genauere Analyse der Parameter der Infektionsbedingungen, wie z.B. Temperatur, Medium der Wirtsbakterien, mehrfaches Waschen der Bakterien usw. eine Steigerung der Infektiosität der Komplexmoleküle zu erwarten wäre.

Die mit dem RNA-A-Proteinkomplex erzielten Infektiositätsausbeuten von 2×10^{-6} pfu's /Komplexmolekül erscheinen gering im Vergleich zu den Phagen, aus denen die Komplexmoleküle isoliert wurden. Ein sehr positives Bild ergibt sich jedoch, wenn man Vergleiche anstellt zu den Infektiositätsausbeuten, die in der Literatur bei der in

vitro-Rekonstitution ganzer Phagen erhalten wurden. Diese liegen zumeist in der Größenordnung von 10^{-7} - 10^{-8} Plaques/ eingesetztem RNA-Molekül, während nur in einem einzigen Falle (Roberts u. Argetsinger-Steitz, 1967) als höchste Ausbeute 2×10^{-6} Plaques/eingesetztem RNA-Molekül erreicht wurden.

Das heißt: der isolierte RNA-A-Proteinkomplex ist genauso infektiös wie die besten in vitro-rekonstituierten Phagen. Aus dieser Sicht heraus ist die mit den Komplexmolekülen erhaltene Infektiositätsausbeute als sehr signifikant zu betrachten.

Es erhebt sich nun die Frage, welche Rückschlüsse aus den bisher vorliegenden experimentellen Befunden auf die in den Phagen vorliegenden Strukturen gezogen werden können. Kurz zusammengefaßt sind folgende experimentelle Resultate vorhanden:

Aus den M12-Phagen ist durch die Methode der Essigsäurefällung ein infektiöser RNA-A-Proteinkomplex isolierbar. Die Anzahl der isolierten Komplexmoleküle ist unabhängig von der RNA- und Proteinkonzentration in den gelösten Essigsäureniederschlägen. Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, daß sich die Komplexmoleküle nicht erst bei der Isolation bilden.

Nicht die gesamte RNA sondern nur ca. 10% der RNA liegen als intakte Moleküle an Protein gebunden im RNA-A-Proteinkomplex vor. Die übrigen 90% sind nicht an Protein gebunden. Sie liegen größtenteils als unterschiedlich degradierte Moleküle vor. Etwa 1 - 2% der RNA finden sich an Protein gebunden in degradiert Form am Gradientenmeniskus vor. Das nicht im Komplex gebundene A-Protein kommt in Aggregaten vor.

Anhand dieser Daten können 4 Denkmöglichkeiten über die in den Phagen vorliegenden Strukturen diskutiert werden:

1) Nur ein Teil der Ausgangsphagen enthält einen RNA-A-Proteinkomplex. Bei der Essigsäurebehandlung der Phagen bleiben diese Komplexmoleküle erhalten, d.h., die Bindung zwischen der RNA und dem A-Protein wird nicht dissoziiert. Ebenso wird nur ein geringer Anteil dieser im Komplex gebundenen RNA-Moleküle durch die Essigsäureeinwirkung hydrolysiert, der als proteingebundene RNA am Gradientenmeniskus bandiert, während die meisten RNA-Moleküle des Komplexes intakt bleiben und daher in der Position intakter RNA-Moleküle im Gradienten auftreten.

In dem anderen Teil der Phagen liegen die RNA und das A-Protein in ungebundener Form nebeneinander vor. Diese RNA wird bei der Essigsäurebehandlung der Phagen größtenteils hydrolysiert und findet sich daher im Gradienten in der Position degradierteter RNA-Moleküle, während das freie A-Protein in aggregierter Form vorliegt.

Diese Möglichkeit interpretiert die experimentellen Daten ohne Widerspruch. Es bleibt jedoch zu erklären, warum die im Komplex gebundenen RNA-Moleküle weniger degradiert werden als die ungebundenen RNA-Moleküle. Eine Erklärungsmöglichkeit besteht in der Annahme, daß die im Komplex gebundenen RNA-Moleküle in den Phagen eine andere Konformation als die ungebundenen RNA-Moleküle besitzen, die ihre Präzipitation bei der Essigsäurebehandlung der Phagen gegenüber der Hydrolyse stark begünstigt.

2) Alle Ausgangsphagen enthalten ihre RNA und ihr A-Protein im Komplex gebunden. Bei der Essigsäurebehandlung der Phagen bleibt nur ein kleiner Teil dieser Komplexmoleküle erhalten, während der größte Teil zerstört wird, wobei sowohl die Bindung zwischen der RNA und dem A-Protein

dissoziiert als auch die RNA degradiert wird. Nach dieser Denkmöglichkeit sind im Gradienten ungefähr gleichverlaufende Profile für die Gesamt-RNA wie für die proteingebundene RNA zu erwarten, d.h., proteingebundene RNA muß auch im Bereich degradierter RNA-Moleküle bandieren. Dies wurde jedoch nicht gemessen. Die Unterschiede in den gemessenen Profilen können nur erklärt werden, wenn angenommen wird, daß die Dissoziation der RNA-A-Proteinbindung im Komplex stets vor der Degradation der RNA stattgefunden hat, was sehr unwahrscheinlich ist. Diese Möglichkeit scheidet daher aus.

3) In allen Ausgangsphasen liegen die RNA und das A-Protein in ungebundener Form nebeneinander vor. Bei der Essigsäurefällung wird ein großer Teil der RNA-Moleküle degradiert. Beim Auflösen der Essigsäureniederschläge bindet ein Teil des A-Proteins an intakt gebliebene RNA-Moleküle, während der andere Teil aggregiert.

Diese dritte Möglichkeit ist jedoch aus drei Gründen sehr unwahrscheinlich.

Einmal liefert die Unabhängigkeit der Zahl der isolierten Komplexmoleküle von der RNA- und A-Proteinkonzentration einen Anhaltspunkt dafür, daß keine Komplexmoleküle nach dem Lösen der Essigsäureniederschläge entstehen. Ferner müßte man eine sehr spezifische Wechselwirkung zwischen intakten RNA-Molekülen und A-Protein annehmen, um zu erklären, warum das A-Protein nur an intakte RNA-Moleküle bindet nicht jedoch an degradierte.

Weiterhin demonstrieren alle bisherigen Experimente, daß der Komplex ein infektiöses Partikel ist. Wenn dieser nicht in den Phagen vorkommt, sondern sich erst bei der Isolation bildet, zeigt ein Isolationsartefakt biologische Aktivität, was unsinnig erscheint.

4) Ein Teil der Ausgangsphagen enthält einen RNA-A-Proteinkomplex. Bei der Essigsäurebehandlung der Phagen werden die Komplexmoleküle dissoziiert und ein großer Teil der RNA der Phagen wird degradiert. Beim Auflösen der Essigsäureniederschläge bindet ein Teil der A-Proteinmoleküle an intakt gebliebene RNA-Moleküle, wobei die gleichen Komplexmoleküle entstehen, die ursprünglich im Phagen vorlagen.

Gegen ein Entstehen der Komplexmoleküle nach dem Lösen der Essigsäureniederschläge sprechen wiederum die gleichen Gründe, die bereits unter 3) aufgezählt wurden. Daher ist diese vierte Denkmöglichkeit ebenfalls als unwahrscheinlich anzusehen.

Nach diesen Überlegungen bleibt die erste Denkmöglichkeit als die wahrscheinlichste bestehen.

Im dritten Teil der Arbeit werden Untersuchungen zu ihrer Überprüfung beschrieben werden.

II. Untersuchungen über das A-Protein des Phagen M12

a) Untersuchungen über den A-Proteingehalt des Phagen M12

Nachdem das A-Protein als Strukturkomponente von RNA-Phagen identifiziert worden war (Argetsinger-Steitz 1968 a, Viñuela u. Mitarb. 1968), wurde es zum ersten Male von Argetsinger-Steitz (1968 b) aus dem RNA-Phagen R17 in 90%iger Reinheit isoliert. Die Aminosäureanalyse des isolierten Proteins ergab u.a. 5 Histidinreste pro Molekül. Von diesem Ergebnis ausgehend war es möglich, die durchschnittliche Zahl der A-Proteinmoleküle pro Phage zu ermitteln, da 1965 von Enger und Kaesberg und 1967 von Weber nachgewiesen worden war, daß das Coatprotein des Phagen R17 kein Histidin enthält. Argetsinger-Steitz züchtete zu diesem Zwecke Wildtypphagen und markierte deren A-Protein spezifisch mit ^3H -Histidin, indem sie die Phagen auf Bakterien vermehrte, die auxotroph für Histidin waren und errechnete dann die Anzahl der in den gereinigten Phagen vorhandenen Histidinreste mit Hilfe der bekannten spezifischen Radioaktivität des für die Markierung eingesetzten ^3H -Histidins. Als Ergebnis erhielt sie ca. 4 Histidinreste pro Phage. Da ein Molekül A-Protein 5 Histidinreste enthielt, folgte daraus, daß ca. 1 Molekül A-Protein pro Phage existiert.

Diese Arbeit von Argetsinger-Steitz blieb bis heute die einzige, die direkt den A-Proteingehalt eines RNA-Phagen bestimmte. Die Gründe hierfür dürften einmal in den außerordentlich geringen Mengen des in den Phagen vorliegenden A-Proteins liegen, zum anderen in seinen unangenehmen Eigenschaften wie Unlöslichkeit in Puffern ohne stark denaturierende Agenzien und starke Adsorption an Oberflächen aller Art.

Alle späteren Publikationen anderer Autoren, die im Zusam-

menhang mit dem A-Protein anderer RNA-Phagen erschienen, gingen davon aus, daß auch in diesen Phagen im Durchschnitt 1 Molekül A-Protein pro Phage vorkommt, wobei sie die Arbeit von Argetsinger-Steitz zitierten.

Nach eigenen Analyseergebnissen über die Proteinzusammensetzung von markierten ^{35}S -M12-Phagen aus verschiedenen Präparationen, mußte jedoch angezweifelt werden, daß M12-Phagen konstant ein Molekül A-Protein pro Phage enthalten. Wurden Phagen aus verschiedenen Präparationen untersucht, so lag meist ein unterschiedlicher Prozentsatz der gesamten radioaktiven Markierung im A-Protein vor. Dies konnte auf zweierlei Weise gezeigt werden:

1) Der im A-Protein der Phagen vorliegende ^{35}S -Markierungsanteil wurde durch Phenolextraktion der Proteine aus den intakten Phagen (s. ET, S.116) und deren Trennung im SDS-Polyacrylamidgel bestimmt (s. ET, S.117). Entsprechend dem Molekülverhältnis der beiden Proteine im Phagen lag dabei die ^{35}S -Radioaktivität zu mindestens 98% im Coatprotein und nur zu einem kleinen, je nach Phagenpräparation jedoch unterschiedlichem Prozentsatz im A-Proteingipfel vor.

2) Der in den Phagen vorkommende ^{35}S -Markierungsanteil des A-Proteins wurde aus den Essigsäureniederschlägen bestimmt, in die das A-Protein nahezu quantitativ neben weniger als 1% des Coatproteins präzipitiert (s. S.15). Daher ist die dort vorliegende ^{35}S -Radioaktivität proportional zum Prozentsatz der gesamten ^{35}S -Markierung im A-Protein der Phagen. Die ^{35}S -Proteine wurden mit Phenol aus den Essigsäureniederschlägen extrahiert (s. ET, S.117) und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei diesen Untersuchungen variierte die in den Essigsäureniederschlägen vorhandene ^{35}S -Radioaktivität, die sich zusammensetzt aus der im A- und Coatprotein vorliegenden Markierung, zwischen 0,6 - 3% der Gesamtmarkierung der jeweils zur Essigsäurefällung einge-

setzten ^{35}S -Phagen. Proportional dazu war auch der Prozentsatz der Markierung im A-Protein unterschiedlich, der aus dem erhaltenen Markierungsverhältnis zwischen A- und Coatprotein im Gel errechnet wurde.

Die Resultate sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Die aus dem Essigsäureniederschlag und aus den Phagen ermittelten Markierungsanteile für das A-Protein aus einer Phagenpräparation stimmten dabei innerhalb der Fehlergrenzen gut überein.

Aus den unterschiedlichen Prozentsätzen der Gesamtmarkierung im A-Protein verschiedener Phagenpräparationen muß auf eine unterschiedliche Anzahl von A-Proteinmolekülen in den Phagen geschlossen werden, da von einer konstanten Anzahl Coatproteinmolekülen/pro Phage ausgegangen werden kann (180 Moleküle Coatprotein/Phage nach Vasquez u. Mitarb., 1966). Dies wurde durch ein konstantes Extinktionsverhältnis $E_{260}/E_{280} = 1,83$ für die M12-Phagen aus allen Präparationen überprüft.

Die gesamte ^{35}S -Markierung der Phagen ist dann auf 180 Moleküle Coatprotein und x-Moleküle A-Protein verteilt. Wie erwartet, liegt daher der Hauptanteil der Proteinmarkierung der Phagen im Coatprotein vor, wenn die Phagenproteine auf SDS-Polyacrylamidgelen getrennt werden.

Den jeweils untersuchten Phagen kann nun ein bestimmter A-Proteingehalt zugeordnet werden unter der Annahme einer gleichmäßigen Markierung von A- und Coatprotein mit ^{35}S . Danach sollte ein Molekül A-Protein (MG:39.000 D) das 2,8fache an ^{35}S -Markierung enthalten wie ein Molekül Coatprotein (MG:14.000 D) entsprechend seinem 2,8fachen Molekulargewicht. 1,5% der ^{35}S -Markierung einer Phagenlösung sollten dann im A-Protein zu finden sein, wenn ein Molekül

A-Protein pro Phage vorhanden wäre. Aus den in Tab. 8 angegebenen Prozentzahlen der Gesamtmarkierung für das A-Protein läßt sich dann in einfacher Weise die Zahl der A-Proteinmoleküle in den Phagen errechnen. Die erhaltenen Werte sind in Spalte 5 der Tab. 8 eingetragen.

Es ist zu berücksichtigen, daß diese Werte nur dann die 'wirklichen' Molekülzahlen für das A-Protein angeben, wenn die bei der Kalkulation getroffene Annahme der gleichmäßigen Markierung von A- und Coatprotein mit ^{35}S richtig ist. Diese wäre überprüfbar, wenn die Zahl der Methionin- und Cysteinreste im A- und Coatproteinmolekül, in denen die ^{35}S -Markierung vorliegt, miteinander verglichen werden könnte.

Dies war jedoch nicht möglich, da nur die Aminosäurezusammensetzung des Coatproteins (Enger u. Kaesberg, 1965), aber nicht die des A-Proteins von M12 aufgeklärt ist.

Als bisheriges Ergebnis ist festzuhalten:

Der A-Proteingehalt in Phagen aus verschiedenen Präparationen ist nicht konstant, sondern kann variieren. Dafür kann es zwei Gründe geben:

So ist es erstens möglich, daß bei verschiedenen Phagenzuchten unterschiedlich viel A-Protein in die Phagen eingebaut wird. Trifft dies zu, dann müssen diese Phagen nach methodisch gleicher Aufarbeitung und Reinigung unterschiedlich viel A-Protein enthalten. In den ersten 4 und den letzten 6 Zeilen von Tab. 8 sind jeweils die Werte für den A-Proteingehalt in Phagen aus verschiedenen Zuchten zusammengestellt, die jeweils gleich aufgearbeitet und gereinigt wurden. Es ist ersichtlich, daß die Zahl der A-Proteinmoleküle pro Phage variiert.

Dieses Ergebnis spricht sehr für die Annahme, daß bei der Biosynthese der Phagen unterschiedlich viel A-Protein in die Phagen eingebaut werden kann.

Tabelle 8

Zahl der CsCl-Gradienten	³⁵ S cpm im A-Protein nach Phenol-extraktion aus den Phagen (in % der Phagenmarkierung)	³⁵ S cpm im A-Protein nach Phenol-extraktion aus den Essigsäureniederschlägen (in % der Phagenmarkierung)	³⁵ S cpm in den Essigsäureniederschlägen (in % der Phagenmarkierung)	kalkulierte Zahl der A-Proteinmoleküle pro Phage
1	1,7	1,6	3,0	1,2
1 ^A	0,7	0,7	1,2	0,5
1	1,5	1,4	2,4	1,0
1 ^B	1,2	1,2	2,0	0,9
2	0,8	0,7	1,3	0,5
2	0,9	1,0	1,6	0,6
2 ^A	0,4	0,3	0,6	0,2
2	0,5	0,6	0,9	0,3
2 ^B	0,7	0,6	1,1	0,5
2	0,7	0,7	1,1	0,5

Zahl der A-Proteinmoleküle in M12-Phagen:

In Spalte 1 ist die Zahl der CsCl-Gradienten eingetragen, über die die ³⁵S-Phagen gereinigt wurden. Der Infektiositätstiter der Phagen variierte zwischen 3 - 10%. Spalte 2 bzw. 3 gibt den Prozentsatz der gesamten Phagenmarkierung im A-Protein an nach Phenolextraktion der Proteine aus den Phagen bzw. aus den Essigsäureniederschlägen und nach Trennung auf SDS-Polyacrylamidgelen. In Spalte 4 ist der Prozentsatz der gesamten Phagenmarkierung, der in den Essigsäureniederschlägen vorliegt, eingetragen. Die Indices A und B bezeichnen zwei Phagenpräparationen A und B, deren A-Proteingehalt nach Reinigung über einen und über zwei CsCl-Gradienten bestimmt wurde.

Zweitens ist es möglich, daß Phagen bei bestimmten Reinigungsschritten einen Teil ihres A-Proteins verlieren. Dann müßten Phagen der gleichen Zucht, die verschieden aufgereinigt wurden, einen unterschiedlichen A-Proteingehalt aufweisen.

Alle Phagenpräparationen wurden stets genau gleich aufgearbeitet und gereinigt mit dem einzigen Unterschied, daß einige nur über einen, andere jedoch über zwei CsCl-Gradienten zentrifugiert wurden.

Aus Tab. 8 ist ersichtlich, daß Phagen nach Reinigung über einen CsCl-Gradienten zumeist mehr A-Protein enthielten als nach zwei CsCl-Gradienten. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die Phagen bei der CsCl-Gradientenzentrifugation einen Teil ihres A-Proteins verlieren.

Der Verlust von A-Protein bei der CsCl-Gradientenzentrifugation wurde direkt an zwei Phagenpräparationen gezeigt, indem ihr A-Proteingehalt jeweils nach einem und nach zwei CsCl-Gradienten bestimmt wurde durch Phenolextraktion der Proteine und deren Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. In beiden Fällen enthielten die Phagen nach dem zweiten CsCl-Gradienten nur noch ca. halb soviel ³⁵S-Markierung im A-Protein wie nach dem ersten (s. Tab. 8).

Der A-Proteinverlust der Phagen bei der ersten CsCl-Gradientenzentrifugation wurde nicht bestimmt. Dazu wäre es nämlich notwendig gewesen, den A-Proteingehalt der Phagen vor der ersten CsCl-Gradientenzentrifugation zu ermitteln. Hier wären jedoch nur sehr ungenaue Resultate zu erwarten gewesen, weil die Phagen vor dem ersten CsCl-Gradienten durch Wirtsproteine stark verunreinigt sind und andere Reinigungsmethoden, die ohne A-Proteinverlust verlaufen, bei weitem nicht so effizient wie die CsCl-Gradientenzentrifugation sind.

Nach Tab. 8 variiert die Zahl der A-Proteinmoleküle/Phage in verschiedenen Phagenpräparationen, die über einen bzw. zwei CsCl-Gradienten gereinigt worden waren, zwischen 0,5 - 1,2 bzw. 0,2 - 0,6.

Diese Variation muß auf einen realen Unterschied im A-Proteingehalt der Phagen zurückgeführt werden, da sie weit außerhalb der durch Meßfehler bedingten Schwankung ($\pm 20\%$) liegt.

b) Molekulargewichtsbestimmung des A-Proteins mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Molekulargewicht des A-Proteins wurde bestimmt mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach einer modifizierten Methode von Weber und Osborn (1969).

Zwei A-Protein haltige Lösungen, in denen das A-Protein im Vergleich zum ganzen Phagen gegenüber dem Coatprotein stark angereichert vorlag, wurden gewonnen durch Phenol-extraktion der Proteine aus zwei Essigsäureniederschlägen (s. ET, S.117), die je aus $2,3 \times 10^{14}$ Phagen isoliert worden waren. Die Proteinlösungen enthielten ca. 7% A- und 5% Coatprotein.

Die Durchführung der Elektrophorese der beiden Proteinlösungen zusammen mit den Eichproteinen und die Ermittlung der elektrophoretischen Beweglichkeiten ist im experimentellen Teil beschrieben.

Die Zehnerlogarithmen der Molekulargewichte der Eichproteine wurden gegen ihre in 2 Parallelproben gemessenen elektrophoretischen Beweglichkeiten aufgetragen. Die erhaltenen Punkte lagen auf einer Geraden. Die aus den beiden Parallelproben erhaltenen Geraden zeigen einen identischen Verlauf (s. Abb. 14). Für das A-Protein wurden elektrophoretische Beweglichkeiten von 0,53 und 0,56 gemessen, denen anhand der Geraden die Molekulargewichte 40.000 und 38.000 D zugeordnet wurden. Die Werte für die elektrophoretischen Beweglichkeiten des Coatproteins betrugen 0,92 und 0,93, woraus sich Molekulargewichte von 14.000 und 13.500 D errechneten. Als arithmetischer Mittelwert ergibt sich aus den beiden Molekulargewichtsbestimmungen für das A-Protein ein Molekulargewicht von 39.000 D und für das Coatprotein von 13.750 D. Das Molekulargewicht des A-Proteins von M12 liegt in dem Wertbereich, der für das A-Protein der verwandten

Phagen R17 (Argetsinger-Steitz, 1968 b: 37.500 D) und f2 (Herrmann, 1970 : 41.500 D) unter Anwendung der gleichen Methode gemessen wurde.

Das ermittelte Molekulargewicht des Coatproteins vom M12 stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten für das Coatprotein von RNA-Phagen der f2-Gruppe überein (Enger u. Kaesberg, 1965, Weber u. Osborn, 1969).

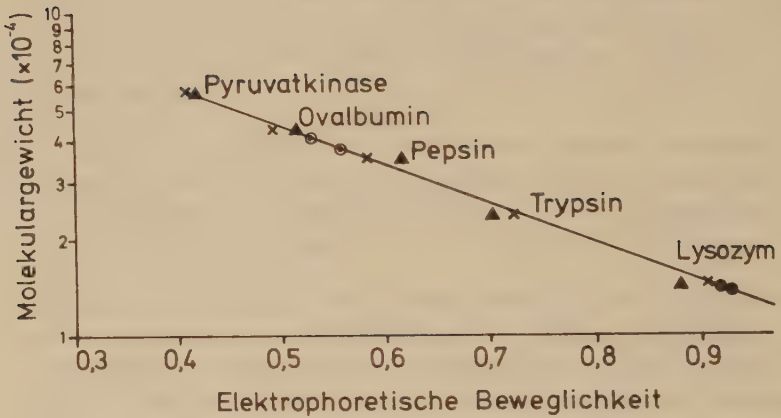


Abb. 14: Molekulargewichtsbestimmung des A-Proteins mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

▲, x : elektrophoretische Beweglichkeit der Eichproteine in zwei parallelen Messungen.

○, ● : elektrophoretische Beweglichkeit des A- bzw. Coat-proteins aus zwei parallelen Messungen.

Diskussion

Nach den in diesem Teil der Arbeit vorgelegten Ergebnissen kann folgendes festgestellt werden:

1) Die Zahl der in M12-Phagen vorhandenen A-Proteinmoleküle ist nicht konstant, sondern kann bis um den Faktor 2 variieren in methodisch gleich aufgearbeiteten und gereinigten Phagen verschiedener Präparationen. Demnach werden bei der Phagenreifung in den Wirtszellen unterschiedliche Mengen von A-Proteinmolekülen in die Phagen eingebaut. Einer der Gründe hierfür könnte sein, daß die Belüftung bei jeder Phagenzucht variiert. Ebenso dürfte ein unterschiedlicher physiologischer Zustand der Wirtsbakterien eine Rolle spielen.

2) Die Phagen verlieren bei ihrer Reinigung über CsCl-Gradienten einen Teil ihres A-Proteins. So zeigen über einen CsCl-Gradienten gereinigte Phagen bei der Zentrifugation über einen zweiten Gradienten einen etwa 50%igen Verlust ihres A-Proteins.

Dieses Ergebnis stimmt prinzipiell mit den von Verbraeken u. Piers (1972) am Phagen MS2 festgestellten Befunden überein. Diese Autoren reinigten die Phagen über einen Glyceringradienten anstelle des CsCl-Gradienten und fanden danach 1 Molekül A-Protein/Phage. Nach Zentrifugation über einen CsCl-Gradienten enthielten die Phagen nur noch ca. 0,5 Moleküle und nach weiterer Reinigung über einen zweiten CsCl-Gradienten nur noch ca. 0,1 Moleküle A-Protein/Phage. Die MS2-Phagen verloren demnach etwa 80% ihres A-Proteins bei der Reinigung über einen zweiten CsCl-Gradienten, während der Verlust beim Phagen M12 nur etwa 50% betrug. Diese Unterschiede sind erklärbar einmal mit den verschiedenen Züchtungs- und Aufarbeitungsmethoden, die zur Isolierung der beiden Phagenlösungen angewendet wurden, und

zum zweiten im ganz besonderen Maße mit den unterschiedlichen Zentrifugationszeiten im CsCl-Gradienten - die MS2-Phagen wurden 30, die M12-Phagen jedoch nur 20 Stunden im CsCl-Gradienten zentrifugiert - die sicherlich einen entscheidenden Einfluß auf die Verlusthöhe des A-Proteins haben.

Die Tatsache, daß das A-Protein durch Einwirkung der hohen Salzkonzentration im CsCl-Gradienten vom Phagen dissoziiert, deutet darauf hin, daß ionische Bindungen bei der Wechselwirkung zwischen A-Protein, Coatproteinhülle und/oder RNA eine Rolle spielen.

Eine genaue Aussage über die Zahl der A-Proteinmoleküle in ungereinigten Phagen kann anhand der durchgeführten Experimente nicht gemacht werden, weil aus den auf S.84 dargelegten Gründen nicht ermittelt wurde, wie hoch der A-Proteinverlust beim Reinigen der Phagen über den ersten CsCl-Gradienten ist.

Man kann annehmen, daß in den ungereinigten Phagen mindestens 1 Molekül A-Protein pro Phage vorliegt, da die Phagen selbst nach Reinigung über einen CsCl-Gradienten meistens noch ca. 1 Molekül A-Protein enthielten.

Dies ist in Übereinstimmung mit der beobachteten RNase-Resistenz von RNA-Phagen, die nach in vivo-Befunden von Kaerner (1970), von Heisenberg (1966) und von Argetsinger und Gussin (1966) nur dann gegeben ist, wenn bei der Phagenreinigung A-Protein zugegen ist. Wachsen dagegen A-Cistronambrmutanten im nicht permissiven Wirt, so resultieren defekte Phagen, die RNase-sensitiv sind.

Daß mindestens 1 Molekül A-Protein pro Phage in ungereinigten Phagen vorhanden ist, ist auch in Übereinstimmung mit den Befunden von Argetsinger-Steitz (1968 b), die ca. 1 Molekül A-Protein pro R17-Phage angibt nach Reinigung über

1 CsCl-Gradienten. Demzufolge müssen die von Argetsinger-Steitz untersuchten Phagen vor der Reinigung mehr als 1 Molekül A-Protein enthalten haben.

Verbraeken dagegen findet ein Molekül A-Protein/MS2-Phage vor und 0,5 Moleküle nach der Reinigung der Phagen über einen CsCl-Gradienten.

Diese Diskrepanz zwischen den Werten von Argetsinger-Steitz und Verbraeken kann nach den hier am Phagen M12 erarbeiteten Ergebnissen mit dem verschiedenen A-Proteingehalt von Phagen aus verschiedenen Präparationen erklärt werden.

Nimmt man alle Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes Bild für den A-Proteingehalt von RNA-Phagen:

Bei der Synthese der RNA-Phagen in den Wirtszellen werden unterschiedlich je nach Phagenpräparation 1 - 2 Moleküle A-Protein, mindestens jedoch ein Molekül A-Protein in jedem Phagen eingebaut. Gleich aufgearbeitete und gereinigte Phagen aus verschiedenen Präparationen enthalten demzufolge eine unterschiedliche Zahl von A-Proteinmolekülen, die stets geringer ist als vor der Reinigung, weil die Phagen bei der Reinigung über CsCl-Gradienten einen Teil ihres A-Proteins verlieren. In vielen Fällen befindet sich daher in gereinigten Phagenpräparationen weniger als 1 Molekül A-Protein/Phage, was nur heißen kann, daß ein Teil der Phagen kein A-Protein enthält. Diese Feststellung ist von wesentlicher Bedeutung, da sie eine bisher unverstandene Verhaltensweise von RNA-Phagen bei der Wechselwirkung mit ihren Wirtsbakterien erklärt.

So beschrieben Paranchych, Krahn und Bradley 1970, daß in einer gereinigten R17-Phagenlösung ca. 50% der Phagen nicht in der Lage waren, an die F-Pili ihrer Wirtsbakterien zu adsorbieren. Diese nicht adsorbierenden Phagen können nach den hier vorliegenden Befunden nur diejenigen gewesen sein,

die kein A-Protein enthielten, da schon von früheren genetischen Untersuchungen her bekannt ist, daß das A-Protein die Adsorption der Phagen an die F-Pili der Wirtsbakterien besorgt.

Aus den hier vorliegenden und den Daten von Paranchych läßt sich ferner schlußfolgern, daß das in einer Phagenlösung vorhandene A-Protein sich so auf die Phagen verteilt, daß nicht mehr als 1 Molekül A-Protein pro Phage vorkommt. Denn wäre die Verteilung so, daß einige Phagen mehrere A-Proteinmoleküle besäßen, so resultierte daraus zwangsläufig eine viel größere Zahl von Phagen ohne A-Proteinmolekül. In einer Phagenlösung wären dann nur noch sehr wenige Phagen zu entdecken, die an ihre Wirtsbakterien adsorbierten. Dies stünde jedoch im Widerspruch zu den Daten von Paranchych, der bei ca. 50% der Phagen in einer Lösung die Fähigkeit zur Adsorption an die Wirtsbakterien fand.

III. Untersuchungen zum Infektiositätstiter von M12-Phagen

a) Isolation des RNA-A-Proteinkomplexes aus unterschiedlich infektiösen Phagen

Eine bisher ungeklärte Frage ist, warum in einer Phagenlösung stets nur 5 - 10% der Phagen infektiös sind. Daraus ergibt sich die weitere Frage, wodurch sich die infektiösen Phagen von den nicht infektiösen unterscheiden. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß A-Protein in den Phagen vorhanden sein muß, damit sie infektiös sind. So waren Phagen, die nach Infektion von nicht permissiven Wirtszellen mit A-Cistronambermutanten gebildet worden waren, nicht infektiös, obwohl sie infektiöse RNA enthielten (Lodish u. Mitarb., 1965, Heisenberg u. Blessing, 1965, Heisenberg 1967, Argetsinger u. Gussin, 1966).

In vitro-Rekonstitutionen von RNA-Phagen zeigten ebenfalls, daß A-Protein notwendig ist, um infektiöse Phagen zu erhalten (Roberts u. Steitz, 1967, Hung u. Overby 1969, Herrmann 1970).

Die Gegenwart des A-Proteins in den Phagen allein reicht jedoch nicht zur Erklärung des geringen Titers infektiöser Phagen in einer Phagenlösung aus, da nach den Untersuchungen von Argetsinger-Steitz (1968 b) im Schnitt jeder Phage 1 Molekül A-Protein enthält (vergl. S.79). Es muß daher noch einen anderen Grund für die geringe Infektiosität geben.

Im 1. Teil dieser Arbeit wurde von der Isolierung eines RNA-A-Proteinkomplexes aus dem Phagen M12 berichtet, der wie der ganze Phage die Fähigkeit hat, intakte E.coli-Wirtszellen über ihre F-Pili zu infizieren und in ihnen infektiöse Nachkommenphagen zu produzieren. Nach Dissoziation des Komplexes in seine Komponenten geht die Infektiosität verloren.

Die Infektiosität des Komplexes und der Befund, daß stets nur ein Teil der RNA und des A-Proteins in den gelösten Essigsäureniederschlägen als RNA-A-Proteinkomplex vorlag, führte zu der Hypothese, daß der Komplex das infektiöse Agens in den Phagen ist. Danach enthalten in einer RNA-Phagenlösung nur die infektiösen Phagen einen RNA-A-Proteinkomplex. Der Titer der infektiösen Phagen ist dann identisch mit ihrem Komplextitel. Diese Hypothese ist überprüfbar durch Einsetzen unterschiedlich infektiöser Phagen zur Komplexisolierung. Es muß dann jeweils eine unterschiedliche Zahl von Komplexmolekülen isoliert werden, die korreliert ist zum jeweiligen Titer der eingesetzten infektiösen Phagen.

Für diese Experimente wurden drei M12-Phagenlösungen (Reinigung jeweils über einen CsCl-Gradienten) verwendet, in denen jeweils 10%, 7% und 1% der Phagen infektiös waren. In allen drei Phagenpräparationen war die RNA mit ^{32}P markiert, um die Komplexmoleküle als proteingebundene RNA im Nirenberg-Filtertest nachweisen zu können.

Die isolierten Essigsäureniederschläge wurden in Puffer II gelöst. Aliquots der drei Lösungen wurden im Nirenberg-Filtertest untersucht und die Radioaktivität der auf den Filtern gebundenen RNA wurde gemessen. Die Radioaktivität der Gesamt-RNA wurde durch Austropfen von Aliquots auf Nitrocellulosefiltern ermittelt.

Um den Anteil, zu dem freie RNA im Nirenberg-Filtertest auf Filtern zurückgehalten wird, zu bestimmen, wurden aus den drei Phagenpräparationen in gleicher Weise drei Essigsäureniederschläge isoliert, aus denen die RNA mit Phenol extrahiert wurde. In diesen drei Lösungen wurde ebenfalls die Gesamt-RNA wie die auf den Filtern im Nirenberg-Test zurückgehaltene RNA gemessen.

Die Daten und Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Es wurde sowohl für die gelösten Essigsäureniederschläge wie für die phenolextrahierten Kontroll-RNA-Lösungen errechnet, wieviel Prozent der Gesamt-RNA jeweils der im Nirenberg-Filtertest gemessenen Radioaktivität entsprach. Dabei ergab sich, daß in allen drei phenolextrahierten RNA-Lösungen ca. 9% der RNA auf den Filtern im Nirenberg-Test festgehalten wurden.

Der Prozentsatz der RNA in den gelösten Essigsäureniederschlägen, der auf dem Filter im Nirenberg-Test zurückgehalten wurde, war dagegen korreliert zu dem Infektiositätstiter der zur Essigsäurefällung verwendeten Phagen: für die 10%, 7% und 1% infektiösen Phagen wurden 20, 16 und 10% der gesamten ^{32}P -Radioaktivität im Nirenberg-Test gezählt. Nach Subtraktion der 9% für die phenolextrahierte RNA resultierten die Prozentsätze, zu denen die RNA der Essigsäureniederschläge in den Komplexmolekülen gebunden war. Danach lagen in den 10, 7 und 1% infektiösen Phagen jeweils 11,7 und ca. 1% ihrer RNA im Komplex gebunden vor.

Ein Aliquot des gelösten Essigsäureniederschlages, der aus den 1% infektiösen Phagen isoliert worden war, wurde im Saccharosegradienten analysiert. Die Fraktionen wurden im Nirenberg-Filtertest untersucht und ihre Gesamt-RNA gemessen wie in Abb. 7 beschrieben. Der in Abb. 15 dargestellte Gradient läßt keinen Gipfel an proteingebundener RNA des

Tabelle 9

I	II	III	IV	V	VI
Gesamt-RNA im EN	RNA im N.-Test des EN	Ph.-RNA aus dem EN	Ph.-RNA im N.-Test aus dem EN	Komplex-RNA in % der Gesamt- RNA im EN	Infektiositäts- titer der zur EF. eingesetzten M12- phagen (in % des phys. Phagentiters)
(³² P-cpm)	(³² P-cpm)	(³² P-cpm)	(³² P-cpm)		
4,73 x 10 ⁶	9,39 x 10 ⁵	2,84 x 10 ⁶	2,56 x 10 ⁵	11	10
3,67 x 10 ⁶	5,82 x 10 ⁵	1,81 x 10 ⁶	1,58 x 10 ⁵	7	7
2,58 x 10 ⁵	2,52 x 10 ⁴	1,42 x 10 ⁵	1,23 x 10 ⁴	ca. 1	1

Korrelation zwischen den Infektiositätstitern der zur Essigsäurefällung verwendeten M12-Phagen und der in den gelösten Essigsäurefällungen ermittelten Komplextitern.

Jeder in den Spalten I - VI angegebene Wert stellt den arithmetischen Mittelwert aus je 5 Messungen mit Aliquots der Proben dar.

Die Abkürzungen bedeuten: EN: Essigsäureniederschlag, N.-Test: Nirenberg-Test, Ph.-RNA: Phenolextrahierte RNA, EF: Essigsäurefällung, phys.: physikalisch.

Alle angegebenen Werte beziehen sich jeweils auf die ganze Probe.

Komplexes mehr erkennen, wie er z.B. in der gelösten Essigsäurefällung, die aus 10% infektiösen Phagen isoliert worden war (s. Abb. 7), im Gradienten gefunden wurde. Vielmehr verteilt sich die im Nirenberg-Test ermittelte Radioaktivität über den ganzen Gradienten.

Nach diesen Resultaten ist in den gelösten Essigsäureniederschlägen innerhalb der Meßgenauigkeit der Prozentsatz der im Komplex gebundenen RNA stets ca. genauso groß wie der Prozentsatz der infektiösen Phagen, die zur Komplexisolierung eingesetzt wurden.

Die aufgestellte Hypothese, wonach der Infektiositätstiter von RNA-Phagen gleich ihrem Komplextiter ist, d.h., also nur die Phagen, deren RNA mit dem A-Protein im Komplex gebunden vorliegen, infektiös sind, wird durch diese Ergebnisse sehr stark gestützt.

Ferner demonstriert die experimentell ermittelte Gleichheit zwischen dem Infektiositäts- und dem Komplextiter, daß die Komplexmoleküle nicht erst bei der Isolation entstehen. Denn es gibt keine vernünftige Erklärung dafür, weshalb stets zufällig soviele A-Proteinmoleküle an die RNA binden, daß die resultierende Zahl der Komplexmoleküle gleich der der infektiösen Phagen ist.

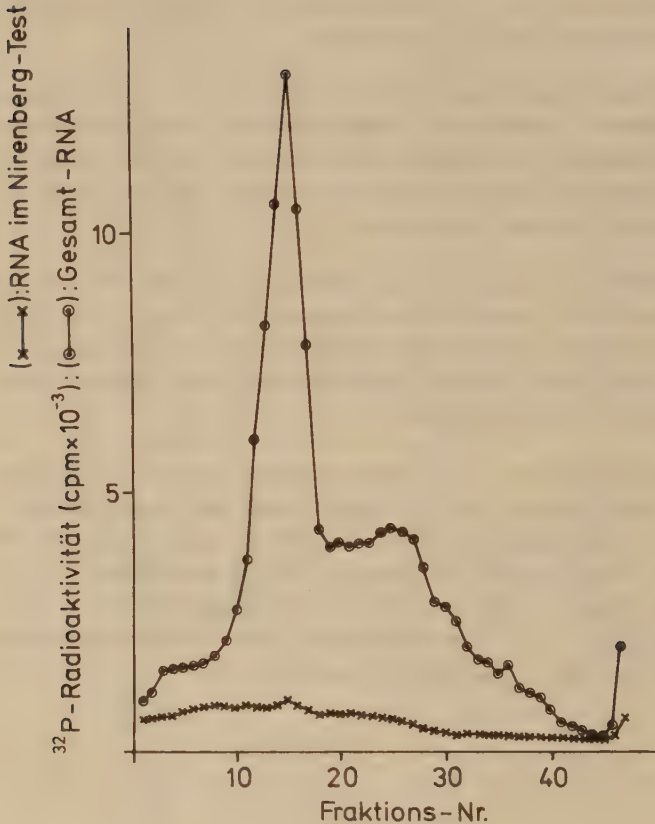


Abb. 15: Verteilung der gesamten RNA und der im Nirenberg-Test zurückgehaltenen RNA in einem Saccharosegradienten, der mit einer Lösung eines ^{32}P -markierten Essigsäureniederschlages in Puffer II beschickt wurde (15 - 30% Saccharose in Puffer II, SW 41-Rotor, 20 Stunden bei 35.000 Upm und 0°C). 1% der Phagen, aus denen der Essigsäureniederschlag isoliert wurde, waren infektiös.

Diskussion

Die in diesem Teil der Arbeit geschilderten Versuchsergebnisse, die die Gleichheit zwischen dem Infektiositäts- und dem Komplex-titer in verschiedenen infektiösen Phagen zeigen, unterstützen die aufgestellte Hypothese, nach der nur in den infektiösen Phagen einer Phagenlösung die RNA und das A-Protein als Komplex vorliegen. Diese Aussage ist jedoch auf frisch hergestellte Phagen beschränkt, da nur solche für die Untersuchungen benutzt wurden.

Nicht untersucht wurde die Frage, ob der bei monatelangem Altern von unmarkierten RNA-Phagen zu beobachtende Infektiositätsverlust auf einer langsamen Dissoziation der RNA-A-Proteinkomplexmoleküle in den infektiösen Phagen beruht, oder durch andere ablaufende Prozesse wie Denaturierung der Proteine (Turri u. Mitarb., 1965) oder Hydrolyse der RNA (Ginoza u. Mitarb. 1964) hervorgerufen wird.

In früheren Arbeiten wurde bewiesen, daß A-Protein in den RNA-Phagen vorhanden sein muß, damit sie infektiös sind (vergl. S. 93).

Nach den hier vorgetragenen Ergebnissen ist zusätzlich zur Gegenwart des A-Proteins seine Bindung an die RNA notwendig, damit die Phagen infektiös sind. Da nur in wenigen Phagen (ca. 10%) einer Phagenlösung die RNA und das A-Protein als Komplex vorliegen, ist der Infektiositätstiter der RNA-Phagen so gering. Nur diese Phagen injizieren offenbar ihre RNA bei der Infektion in die Wirtszellen. Dies erklärt die Ergebnisse von Paranchych und Mitarb. (1970 u. 1971), nach denen nach der Infektion von Bakterien mit dem RNA-Phagen R17 stets nur ein geringer Teil (ca. 10%) der Phagen-RNA in den Zellen vorlag, während der größte Teil (ca. 90%) außerhalb der Zellen verblieb.

Kozak und Nathans (1971) fanden sogar einen Teil der nach Infektion in den Zellen vorliegenden phagenspezifischen RNA mit dem A-Protein und dem Coatprotein gemeinsam in einem Gipfel im Saccharosegradienten bandieren und folgerten daraus, daß das A-Protein bei der Phageninfektion gemeinsam mit der RNA an diese gebunden als Komplex in die Zellen gelangt.

Es ist zwar daran zu zweifeln, ob dies die richtige Folgerung aus den experimentellen Daten war, da die unter dem RNA-Gipfel bandierenden Proteine nicht von einem RNA-A-Proteinkomplex sondern von den Phagen herrühren konnten, die die Präparation verunreinigten. Immerhin unterstützen diese Ergebnisse, ihre Richtigkeit vorausgesetzt, als in vivo-Befunde die in dieser Arbeit erhaltenen in vitro-Resultate.

Da die RNA nur im RNA-A-Proteinkomplex aber nicht als freie RNA gegenüber ganzen E.coli-Zellen infektiös ist, ist zu fragen, auf welche Weise das gebundene A-Protein die Infektiosität der RNA hervorruft. Hierbei sind mehrere Möglichkeiten denkbar.

Erstens könnte das A-Protein der RNA des Komplexes eine Konformation geben, die notwendig ist, damit die RNA a) in die Zellen penetrieren kann und b) in den Zellen sowohl als Templat als auch als Messenger bei der Virusvermehrung verwendet wird.

Zweitens könnte das A-Protein den Penetrationsprozeß ermöglichen, indem es durch Wechselwirkung mit dem F-Pilus (Krahn, O'Callaghan u. Paranchych, 1972) die gebundene RNA durch diesen hindurch in die Zelle schleust.

Drittens könnte das A-Protein eine Rolle bei der Regulation der viralen Proteinsynthese zu frühen Zeiten nach Infektion in der Zelle spielen, wenn die Replicase als einziges

phagenspezifisches Protein in nachweisbaren Mengen synthetisiert wird. Die Vorstellung dabei ist, daß das an die parentale virale RNA gebundene A-Protein ausschließlich die Translation des Replicasecistrons erlaubt in Analogie zur Rolle des Coatproteins im RNA-Coatproteinkomplex, das in vitro die Translation des Replicasecistrons inhibiert (vergl. S. 2).

Diese Möglichkeit könnte getestet werden durch Einsetzen des RNA-A-Proteinkomplexes als Messenger bei der in vitro-Proteinsynthese. Dazu wäre es jedoch notwendig, die in den gelösten Essigsäureniederschlägen vorliegenden Komplexmoleküle von den vorhandenen RNA-Fragmenten und A- und Coatproteinaggregaten zu reinigen.

Dies wird sich sicherlich experimentell als schwierig erweisen, da nicht nur darauf geachtet werden muß, daß die RNA des Komplexes während der Reinigungsschritte nicht degradiert wird, sondern außerdem noch dafür Sorge zu tragen ist, daß die Bindung zwischen RNA und A-Protein erhalten bleibt.

Der Mechanismus der in vitro-Inhibition der Translation des Replicasecistrons mit RNA-Coatproteinkomplexmolekülen als Messenger konnte durch die Sequenzanalyse der Bindungsstelle des Coatproteins an die RNA geklärt werden (Bernardi und Spahr, 1972). Dabei wurde gefunden, daß das Coatprotein den intercistronischen Bereich zwischen Coat- und Replicasecistron und den Anfang des Replicasecistrons bedeckt und dadurch die Translation der ersten Codons des Replicasecistrons verhindert.

Analog dazu könnte durch die Sequenzanalyse der Bindungsstelle des A-Proteins an die RNA ein Einblick in den Mechanismus der Regulation der virusspezifischen Proteinsynthese zu frühen Zeiten nach Infektion erhalten werden. Aufschluß über die chemische Wechselwirkung zwischen RNA und

A-Protein im Komplex könnte gewonnen werden, wenn es gelänge, nur die Bindungsstelle des RNA-Moleküls mit dem A-Protein zusammen zu kristallisieren und damit einer Röntgenstrukturanalyse zugänglich zu machen.

Unter Zusammenfassung aller in den drei Teilen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sowie der Einbeziehung von Literaturdaten ergibt sich, daß die in einer Lösung vorliegenden Phagen sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung als auch in ihren biologischen Eigenschaften heterogen sind:

- 1) So enthält stets nur ein geringer Anteil der Phagen (5 - 10%) einen RNA-A-Proteinkomplex. Diese Phagen sind infektiös, d.h. sie können an ihre Wirtsbakterien adsorbieren, ihre RNA injizieren und sich in den Zellen vermehren.
- 2) Ein Teil der Phagen enthält A-Protein, das nicht an die RNA gebunden ist. Diese Phagen sind nicht infektiös. Sie können zwar an die Wirtszellen adsorbieren, aber nicht ihre RNA in diese injizieren.
- 3) In Phagenpräparationen, die durchschnittlich weniger als 1 Molekül A-Protein pro Phage enthalten, gibt es Phagen ohne A-Protein. Diese Phagen sind nicht infektiös. Sie können weder an ihre Wirtsbakterien adsorbieren noch ihre RNA in die Zellen injizieren.

Experimenteller Teil

A. Material

Bakterienstämme:

Escherichia coli K12 AB301 (Hfr, λ^+ , met⁻, RNase I⁻)

E. coli K12 W 945 (F⁺, λ^-), *E. coli* B (F⁻)

Phagen: M12 (Hofschneider, 1963)

Medien:

4YT-Medium (Osborn, Weiner und Weber, 1970):

1 Liter enthält 32 g Trypton (Difco), 20 g Hefeextrakt (Difco) und 5 g Natriumchlorid.

M3-Medium:

1 Liter enthält 17,5 g M3 (Difco).

Delius-Medium ohne Phosphat (nach Delius, Thesis 1966):

1 Liter enthält 30 mg Glycerin, 10 mg Gelatine, 44 mg Calciumchlorid-2-hydrat, 1 g Ammoniumchlorid, 0,6 g Magnesiumsulfat-7-hydrat, 150 ml 0,1 M Tris, 11 g Natriumchlorid, 6 g Kaliumchlorid, 5 g wasserfreie Glukose, 5 g Casamino acids technical (Difco) und 2,5 g Hefeextrakt.

M9-Medium (Favre, Boy de la Tour, Segré und Kellenberger, 1965):

1 Liter enthält 7,0 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat, 3,0 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g Natriumchlorid, 1,0 g Ammoniumchlorid, 4,0 g wasserfreie Glukose, 10 ml 0,01m Calciumchlorid, 10 ml 0,1 m Magnesiumsulfat, 5 g Casamino acids technical. Die Phosphate werden zusammen mit dem Natrium- und Ammoniumchlorid als Konzentrat hergestellt und gesondert sterilisiert. Für Phagenmarkierungen mit

³⁵Sulfat wurde das Magnesiumsulfat durch Magnesiumchlorid ersetzt.

Steitz-Medium (Argetsinger-Steitz, 1968 a):

In einem Liter sind enthalten 5 g Natriumchlorid, 1 g Ammoniumchlorid, 1 ml 1 m Magnesiumsulfat, 3 ml 0,2 m Dikaliumhydrogenphosphat, 4 ml Glycerin, 5 g wasserfreie Glukose, 2 ml 1 m Calciumchlorid, 35 mg Cystein, 35 mg Prolin, je 75 mg von allen anderen Aminosäuren außer Histidin, 10 mg Adenosin und 12,1 g Tris. Der ph-Wert wird mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt.

CW-Agar:

In einem Liter sind enthalten 30 g Casamino acids technical, 20 g Glycerin, 1 g Hefeextrakt, 1 g Magnesiumsulfat-7-hydrat und 10 g Agar (Difco).

Nach dem Sterilisieren wird der ph-Wert mit 1n Natronlauge auf 7 - 8 eingestellt.

Bodenagar:

In einem Liter sind 20 g Bacto-Agar, 8 g Nutrient Broth und 5 g NaCl enthalten. Nach dem Autoklavieren werden 7 ml 1 n Natronlauge dazugegeben.

NTS-Agar:

Ein Liter enthält 10 g Bacto Agar, 8 g Nutrient Broth, 5 g Natriumchlorid und 100 ml Frazer-Konzentrat. Nach dem Autoklavieren werden 120 ml sterile 1 m Mann-Saccharose und 120 ml steriler Verdünnungspuffer dazugegeben.

P-Medium:

1 Liter enthält 11 g Natriumchlorid, 6 g Kaliumchlorid, 5 g Merck-Glukose, 33 mg Kalziumchlorid-Dihydrat, 1 g Ammoniumchlorid, 150 ml 0,1 m Tris, ph 8,5, 16 g Casamino acids,

technical, 750 ml Wasser. Nach dem Autoklavieren werden 100 ml steriles Delius-Phosphat, die 5,4 g Kaliumdihydrogenphosphat und 10,5 g Dikaliumhydrogenphosphat enthalten, dazugegeben.

Sphäroplasten-Medium:

In einem Liter befinden sich 100 g Mann-Saccharose, 1,0 g Merck-Glukose und 20 g Casamino acids, technical.

Puffer:

SSC-Puffer:

1 Liter enthält 0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Tri-Natriumcitrat-2-hydrat.

STE-Puffer:

1 Liter enthält 0,1 M Natriumchlorid, 0,05 M Tris und 0,001 M EDTA. Der ph-Wert wird mit Salzsäure auf 7,0 eingestellt.

Verdünnungspuffer:

Er enthält 0,7% Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, 0,4% Natriumchlorid und 0,3% Kaliumdihydrogenphosphat.

Puffer II:

1 Liter enthält 0,01 M Tris, 0,02 M EDTA und 1% 2-Mercaptoäthanol. Der ph-Wert wird mit Natronlauge auf 7,4 eingestellt.

Puffer III:

wie Puffer II, zusätzlich sind 4 M Natriumchlorid enthalten.

Dialysepuffer:

1 Liter enthält 0,01 M Natriumphosphatpuffer ph 7,2,

0,1% SDS, 4 M Harnstoff und 1% 2-Mercaptoäthanol.

Elektrophoresepuffer:

1 Liter enthält 0,1 m Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 0,1% SDS, 4 M Harnstoff und 1% 2-Mercaptoäthanol.

KCL-Puffer:

1 Liter enthält 0,05 M Tris, 0,01 M Magnesiumacetat, 0,06 M Kaliumchlorid und 1% 2-Mercaptoäthanol. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf 7,8 eingestellt.

Nirenberg-Leder-Puffer (Nirenberg und Leder, 1964):

1 Liter enthält 0,1 M Tris, 0,02 M Magnesiumacetat, und 0,05 M Kaliumchlorid. Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 7,2 eingestellt.

Harnstoff-Puffer:

1 Liter enthält 8 M Harnstoff, 0,05 M Tris, 10^{-3} M EDTA, und 1% 2-Mercaptoäthanol. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf 8,5 eingestellt.

Lysozymlösung:

Eiweißlysozym (Grad I) der Firma Sigma Chemical Company wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,05 m EDTA, pH 8,3 gelöst. Alle Lysozymlösungen wurden stets frisch kurz vor Gebrauch hergestellt.

Phenollösung:

Das Phenol wurde unter Zusatz von Zinkstaub als Reduktionsmittel destilliert. Das destillierte Phenol wurde dann nach Zusatz von 80 mg 8-Hydroxychinolin/l mit sterilem STE-Puffer, der 1% SDS enthielt, gesättigt und in einem sterilen Kolben im Kühlschrank aufbewahrt.

Lyse-Mischung:

Sie setzt sich zusammen aus 17,5 ml 0,5 m Mann-Saccharose,

5 ml 0,1 m Tris, ph 8,1, 1 ml 4 % EDTA-Lösung, ph 8,0 und 1 ml Lysozymlösung (1 mg/ml in Wasser).

Frazer-Konzentrat:

In einem Liter sind enthalten 300 mg Glycerin, 100 mg Gelatine, 442 mg Kalziumchlorid-Dihydrat, 10 g Ammoniumchlorid und 6 g Magnesiumsulfat-7-hydrat.

Lösungen für die Herstellung der Acrylamid-Diacrylatgele:

Lösung a:

Auf 100 ml kommen 0,46 ml TEMED, 0,8 m Natriumphosphatpuffer ph 7,2 und 0,8% SDS.

Lösung b:

Sie enthält 40% (W/V) Acrylamid und 1,08% (V/V) Äthylendiacrylat. Das Acrylamid war aus Chloroform umkristallisiert worden.

Lösung c:

100 ml Lösung enthalten 1 g Ammoniumperoxodisulfat.

Lösung I (Lösungsmittel für Polyacrylamidgele):

Die wäßrige Lösung enthält 10% Piperidin und 10% 'Hyamin 10X' (V/V).

Kinards-Reagenz zur Szintillationsmessung (Kinard, 1957): 3 Volumen Äthanol wurden mit 5 Volumen Dioxan und 5 Volumen Xylol gemischt. Zu einem Liter dieser Lösung wurden 80 g Naphthalin, 5 g PPO und 0,5 g ANPO dazugegeben.

Szintillationsreagenz:

12,5 g PPO und 0,75 g Dimethyl-POPOP wurden in 2,5 l Toluol gelöst durch mehrstündiges Schütteln.

Lösungen für die Herstellung der Acrylamid-Methylenbisacrylamidgele:

Lösung 1: 100 ml Lösung enthalten 22,2 g Acrylamid und 0,6 g Methylenbisacrylamid (umkristallisiert in Aceton).

Lösung 2: 100 ml Lösung enthalten 1 g Ammoniumperoxodisulfat.

Coomassie-Brilliantblau-Lösung:

1,25 g Coomassie-Brilliantblau wurden gelöst in einer Mischung von 454 ml 50%igem Methanol und von 46 ml Eisessig. Nicht gelöste Farbstoffanteile wurden abfiltriert.

Entfärberlösung: Die Lösung enthält 75 ml Eisessig, 50 ml Methanol, und 875 ml Wasser.

B. Methoden

1) Gewinnung und Anreicherung von unmarkierten und radioaktiv markierten M12-Phagen.

a) Herstellung unmarkierter Phagen:

Die Phagen wurden nach einer modifizierten Methode von Osborn, Weiner und Weber (1970) gewonnen.

E.coli-Bakterien des Stammes AB301 aus einer Übernachtskultur in 4YT-Medium wurden 1:100 in das gleiche Medium hinein verdünnt und bei 37° C stark belüftet. Bei einem Zelltitert von 10⁹ Bakterien/ml wurde die Kultur 0,005 molar an Calciumchlorid gemacht (ohne Calciumionen können die Phagen nicht infizieren) und mit M12-Phagen (10⁻² infektiöse Phagen/Bakterium) infiziert. Nach sechs bis sieben Stunden starker Belüftung wurde die Kultur auf 0° C abgekühlt und mit 320 g Ammoniumsulfat/Liter versetzt. Der dabei entstehende Niederschlag stand über Nacht bei 0° C im Kühlraum und wurde am nächsten Morgen in einer Mistralzentrifuge niedertourig bei 5.000 Upm und 0° C für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag, der Phagen, Zelltrümmer und nichtlysierte Zellen enthielt, wurde in SSC-Puffer resuspendiert. Die nicht lysierten Bakterien wurden nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform und 0,1 ml Lysozymlösung/1 ml Lösung durch einstündiges Schütteln bei 37° C im Brutschrank lysiert. Die dabei aus den Zellen austretende Bakterien-DNA verursachte eine starke Zunahme der Viskosität des Lysats, die beseitigt wurde durch einen fünfzehnminütigen Verdau mit RNase freier DNase (10 µg/1 ml Lysat), wozu das Lysat 0,2 molar an Magnesiumsulfat gemacht worden war. Anschließend wurden die immer noch nicht lysierten Bakterien und größere Zelltrümmer durch Zentrifugation in einer MSE-High Speed 18-Zentrifuge bei 12.000 Upm

und 0°C für 30 Minuten abgetrennt. Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde ein zweites Mal zentrifugiert, wenn er nach der ersten Zentrifugation nicht klar war. Er wurde über Nacht bei 0°C im Kühlraum gegen STE-Puffer dialysiert (unter mehrmaligem Pufferwechsel). Anderntags wurden die im Überstand befindlichen Phagen mit PEG-6.000 sedimentiert nach Yamamoto, Alberts, Benzinger, Lawhorne und Treiber (1970).

Dazu wurde soviel festes Natriumchlorid in dem eiskalten Überstand gelöst, daß die Lösung 0,5 molar an Natriumchlorid war. Erst nach dem Auflösen des Natriumchlorids wurden 8% PEG 6.000 (Gewicht/Lösungsvolumen) dazugegeben und unter Rühren gelöst. Nach einstündigem Stehen bei 0°C sind die Phagen in einem Niederschlag konzentriert, der bei 12.000 Upm bei 0°C für 30 Minuten in einer MSE-High Speed 18-Zentrifuge abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Der phagenhaltige Niederschlag wurde in SSC-Puffer suspendiert.

Zur weiteren Reinigung wurde die Phagensuspension in einem diskontinuierlichen CsCl-Stufengradienten sedimentiert, der aus 6 Stufen von CsCl-Lösungen verschiedener, geeigneter Dichten in den 18 ml Gradientenröhrchen des Spinco SW 27,1-Rotors bestand. Der Stufengradient wurde mit Hilfe einer Spritze durch Unterschichten der jeweils leichteren CsCl-Lösung mit der nächst schwereren aufgebaut. Abb. 16 zeigt schematisch die Schichtung der CsCl-Dichtelösungen in dem Gradientenröhrchen.

Die Gradienten wurden vorsichtig mit Hilfe einer Spritze mit 4 ml der Phagensuspension/Gradientenröhrchen überschichtet und für 20 Stunden bei 23.000 Upm und 10°C im SW 27,1-Rotor in einer Ultrazentrifuge (Spinco, Modell L3) zentrifugiert. Dabei sedimentieren die Phagen im Gradienten bis zu der CsCl-Lösungsschicht, deren Dichte der Phagendichte

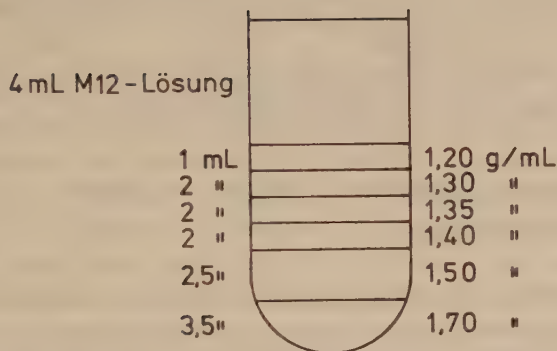


Abb. 16: Schematische Darstellung des CsCl-Stufengradienten, der für die Reinigung der M12-Phagen benutzt wurde. Links des Gradientenröhrchens sind die einpipettierte Milliliter der CsCl-Lösungen (in SSC-Puffer), rechts ihre Dichten angegeben. Der Gradient wurde mit 4 ml Phagenlösung überschichtet.

(1,46 g/ml) entspricht. Man erhält eine scharfe Phagenbande, die aufgrund ihrer Lichtstreuung leicht zu identifizieren ist.

Die Gradientenröhrchen wurden seitlich mit einer Kanüle angestochen und unter den abtropfenden Fraktionen wurde die Phagenbande isoliert.

Diese gereinigten Phagen wurden gegen SSC-Puffer bei 0° C ausdialysiert und gegebenenfalls erneut über einen CsCl-Stufengradienten geschickt und danach wiederum gegen SSC-Puffer ausdialysiert. Die Dialyseschläuche wurden 1 x mit steriler 0,01 m EDTA-Lösung und anschließend 3 x mit sterilem Wasser ausgekocht. Die erhaltenen Phagemengen waren von Präparation zu Präparation unterschiedlich. Im Durchschnitt betrug bei 10 l-Kulturen die Ausbeute an physikalisch erfaßbaren

Phagenpartikeln $1,6-4 \times 10^{17}$. Von diesen Phagen waren durchschnittlich 10% infektiös.

Die Phagen wurden im Eisschrank bei etwa $5 - 8^{\circ} \text{C}$ unter Zusatz von einem Tropfen Chloroform aufbewahrt.

b) Herstellung von radioaktiv markierten Phagen:

I) ^{32}P -markierte Phagen:

E.coli-Bakterien des Stammes AB301 aus einer Übernachtskultur in Delius-Medium ohne Phosphat wurden 1:100 in das gleiche Medium hinein verdünnt und bei 37°C stark belüftet. Bei einem Zelltitert von 3×10^8 Bakterien/ml wurde die Kultur mit Phagen (10 infektiöse Phagen/Bakterium) infiziert. Fünf Minuten nach Infektion wurden 0,5 mCi $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (Büchler und Co., Braunschweig) zu je 10 ml einer Kultur hinzugegeben. Nach 3 - 4 Stunden starker Belüftung wurden nicht lysierte Bakterien nach Zugabe von 1 ml Chloroform/10 ml und 1 ml Lysozymlösung/10 ml Lösung durch 30minütiges Belüften bei 37°C lysiert. Anschließend wurden nicht lysierte Zellen und gröbere Zelltrümmer durch Zentrifugation in einer MSE-High-Speed 18-Zentrifuge bei 12.000 Upm und 0°C für 30 Minuten aus dem Lysat abzentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Phagen wurden mit PEG 6.000 konzentriert und über einen oder zwei CsCl-Stufengradienten gereinigt wie es für die unmarkierten Phagen beschrieben wurde. Nach Dialyse gegen SSC-Puffer wurden die Phagen im Eisschrank bei $5 - 8^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt. Die biologischen Titer dieser Phagen variierten mit 1 - 15% des physikalischen Titters. Die erhaltenen ^{32}P -Markierungen der Phagen lagen zwischen $5 - 10 \times 10^{-6}$ cpm/Phage.

II) ^{35}S -markierte Phagen:

E.coli-Bakterien des Stammes AB301 aus einer Übernachtskultur in M9-Medium mit Magnesiumchlorid wurden 1:100 in das glei-

che Medium hinein verdünnt und bei 37° C stark belüftet. Bei einem Zelltitert von 10^8 Bakterien/ml wurde 1mCi trägerfreies ^{35}S ulfat (Büchler und Co, Braunschweig) zu je 10 ml einer Kultur dazugegeben. Die Kultur wuchs unter starker Belüftung weiter bis zu einem Zelltitert von 3×10^8 Bakterien/ml und wurde dann mit Phagen (10 infektiöse Phagen/Bakterium) infiziert. Nach 3 - 4 Stunden starker Belüftung bei 37° C wurde mit Lysozym die Lyse vervollständigt und die Phagen aus dem Lysat weiter in der gleichen Weise gereinigt wie es für die ^{32}P -Phagen beschrieben wurde.

1 - 10% der gereinigten Phagen waren durchschnittlich infektiös. Bei dieser Methode der Phagenzucht wurden Markierungen zwischen $2 - 6 \times 10^{-7}$ cpm/Phage erhalten. Markierungen in dieser Größenordnung konnten jedoch nur erzielt werden, wenn das radioaktive Sulfat in den Aminosäurepool der Zellen eingebaut war, bevor die Phageninfektion erfolgte. Dies war offenbar der Fall, wenn die Radioaktivität 1,5 Generationszeiten vor der Infektion bei einem Zelltitert von 10^8 Bakterien/ml zu den Zellen gegeben wurde.

Bei gleichzeitiger Phageninfektion und ^{35}S ulfatzugabe bei einem Zelltitert von 3×10^8 Bakterien/ml wurden dagegen die Phagenproteine etwa um eine Zehnerpotenz geringer markiert.

III) ^3H -Histidin-markierte Phagen:

E.coli-Bakterien des Stammes W945 aus einer Übernachtskultur in Steitz-Medium wurden 1:100 in das gleiche Medium hinein verdünnt und bei 37° C stark belüftet. Bei einem Zelltitert von 3×10^8 Bakterien/ml wurden 0,1 m Ci L-2,5 - ^3H -Histidin (Radiochemical Centre, Amersham, England) zu je 10 ml einer Kultur hinzugegeben. Gleichzeitig wurden die Zellen mit Phagen (5 infektiöse Phagen/Bakterium) infiziert. Die Kultur wurde für 3 - 4 Stunden weiterhin stark belüftet. Die ^3H -Histidin-markierten Phagen wurden aus der lysierten Kultur

in der gleichen Weise gereinigt wie es für die ^{32}P -markierten Phagen beschrieben wurde.

5 - 10% der gereinigten Phagen waren im Durchschnitt infektiös. Die erhaltenen Markierungen der Phagen variierten zwischen $1 - 5 \times 10^{-9}$ cpm/Phage.

2) UV-spektroskopische Messungen:

Die Absorptionen der Phagen- und der RNA-Lösungen wurden im Zeiss-Spektralphotometer, Modell PMQII bei 260 nm gemessen.

Mit Hilfe der bekannten spezifischen Extinktion für die Phagen (8,2/mg) und ihre RNA (25/mg) (beide Werte sind der Dissertation von Delius, 1966, entnommen) wurden dann die unbekannten Konzentrationen der Phagen - bzw. RNA-Lösungen errechnet.

3) Präparation der SDS-Acrylamid-Diacrylatgele (nach Viñuela, Algranati und Ochoa, 1967):

Für die Herstellung der Gele wurden immer frisch bereitete Lösungen verwendet.

In einem Meßzylinder wurden 4 ml der Lösung a, 8 ml der Lösung b und 7,7 g Harnstoff zusammengegeben. Nach dem Lösen des Harnstoffes wurde die Lösung mit Wasser auf ein Volumen von 29,5 ml aufgefüllt und kurz durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe entlüftet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 2,5 ml Lösung c gestartet. Die fertige Gelmasse wurde sofort in die Gelröhrchen, die am unteren Ende mit Parafilm verschlossen waren, einpipettiert und vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Nach etwa 30 Minuten waren die Gele erstarrt. Sie wurden mit Parafilm verschlossen und im Eis-schrank aufbewahrt. Sie hatten einen Durchmesser von 0,6 cm und eine Länge von 6,5 - 7,0 cm.

4) Die Isolierung von Essigsäureniederschlägen aus den Phagen:

Aus den Phagenstammlösungen wurden jeweils sovielen Phagen entnommen und in SSC-Puffer suspendiert, daß die Phagenkonzentration zwischen 0,58 - 3,5 mg/ml Lösung lag. Sowohl die eingesetzte Phagenzahl als auch -konzentration ist bei jedem Ansatz im allgemeinen Teil angegeben. Diese Phagenlösung wurde für eine halbe Stunde auf 0° C abgekühlt und dann so schnell als möglich in das doppelte Volumen eiskalten Eisessigs pipettiert und sofort mit einem Whirlmixgerät durchgerührt. Der weiße Essigsäureniederschlag fiel unmittelbar nach dem Zusammengeben der beiden Lösungen aus. Er wurde unter mehrfachem Umrühren für 5 Minuten im Eis aufbewahrt und dann bei 0° C für 30 Minuten bei 5.000 Upm in einer Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert. Der Coatproteinüberstand wurde abpipettiert und der Essigsäureniederschlag wurde kurz mit 2 ml eiskaltem 66%igen Eisessig (1 V SSC-Puffer/2 V Eisessig) gewaschen, um restliches Coatprotein zu entfernen und für 15 Minuten bei 0° C abzentrifugiert. Die Waschlösung wurde abpipettiert und der Niederschlag wurde durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Dieser Trockenvorgang war unbedingt nötig zum späteren Lösen des Niederschlages in Puffer II. Wurde er weggelassen, so ergaben sich große Schwierigkeiten beim Auflösen.

Der getrocknete Niederschlag wurde dann mit 2 ml eiskaltem absoluten Äthanol gewaschen, um Essigsäurereste zu entfernen und für 30 Minuten bei 0° C und 5000 Upm abzentrifugiert. Das Äthanol wurde abpipettiert und der Niederschlag erneut durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Auch dieser Waschschrift war unbedingt notwendig für das Lösen des Niederschlages.

Nach diesen Waschprozeduren wurde der Niederschlag je nach

Experiment in einem bestimmten Puffer gelöst und dann weiter analysiert. In den Fällen, wo radioaktiv markierte Phagen zur Essigsäurefällung verwendet wurden, wurden sie mit jeweils soviel unmarkierten Phagen gemischt, daß die zur Fällung gewünschte totale Phagenkonzentration erreicht wurde. Dabei enthielten die unmarkierten wie die markierten Phagen gleiche Prozentsätze an infektiösen Phagen.

5) Isolation der Phagenproteine mit Phenol aus den Phagen und Vorbereitung für die Gelelektrophorese:

Für die Phenolextraktion der radioaktiv markierten Phagenproteine wurden pro Ansatz ca. $2 - 3 \times 10^{13}$ Phagen, die mit ^{35}S oder ^3H -Histidin markiert waren, in 0,5 ml STE-Puffer, der 1% SDS enthielt, suspendiert. Zu der Phagenlösung wurde ein gleiches Volumen einer Phenollösung gegeben, die mit dem gleichen Puffer gesättigt war. Die Mischung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und die Phenolphase von der wäßrigen, RNA-haltigen Phase durch fünfminütige Zentrifugation bei 5000 Upm in einer Christ-Laborzentrifuge getrennt. Die Phenol- und die wäßrige Phase wurden durch Pipettieren voneinander separiert und jede Phase noch einmal mit Puffer bzw. Phenol extrahiert. Die Phenolphasen wurden vereinigt und die in ihnen enthaltenen Phagenproteine mit einem doppelten Volumen Aceton, das 0,1 molar an Essigsäure war, für 30 Minuten bei 0°C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden bei 5.000 Upm und 0°C für 15 Minuten in einer Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert, einmal mit 5 ml eines Gemisches aus Äthanol und Äther (1:1, V/V) und dann mit 5 ml Äther gewaschen. Nach dem Abpipettieren der Waschflüssigkeit wurde der Proteinniederschlag durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe getrocknet und in 0,16 ml Dialysepuffer gelöst.

Auf ein Ausdialysieren von Phenolresten nach dem Lösen der

gefällten Proteine in Dialysepuffer wurde verzichtet, da hierbei ein großer Teil des A-Proteins, aber auch Coat-protein, an die Oberflächen der Dialyseschläuche adsorbiert. Der Proteinlösung wurden 0,04 ml Glycerin hinzugefügt. Zur Reduktion von bei der Isolation entstandenen intermolekularen Disulfidbrücken der Proteinmoleküle wurde die Lösung für 15 Minuten auf 65° C erwärmt. Das Reduktionsmittel war dabei das im Puffer enthaltene Mercaptoäthanol. Nach der Reduktion wurde die Proteinlösung in der Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

6) Isolation der Phagenproteine mit Phenol aus einem Essigsäureniederschlag:

Die Isolierung und das Waschen von Essigsäureniederschlägen wurde bereits auf S.115 beschrieben. Zur Abtrennung der in einem Essigsäureniederschlag vorhandenen Proteine von der RNA wurde der gewaschene Niederschlag in 0,5 ml STE-Puffer, der 1% SDS enthielt, gelöst und nach Zusatz von 0,05 mg Rinderalbumin wurde die Lösung 3 x mit dem gleichen Volumen Phenol geschüttelt. Die in den vereinigten Phenolphasen befindlichen Proteine wurden gefällt und weiter aufbereitet wie es für die phenolextrahierten Proteine aus den Phagen beschrieben wurde.

7) Auftrennung radioaktiv markierter Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Die Trennung von Proteinen auf Polyacrylamidgelen ist sowohl von der Ladung als auch von der Größe der Proteinmoleküle abhängig (Ornstein 1964, Davis 1964).

Wird die Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergenz SDS ausgeführt, so bindet das Dodecylsulfation an die Proteinmoleküle (Tanford 1968) und ver-

ändert dadurch deren individuelles Ladungsmuster in einer Weise, daß alle Proteinmoleküle negativ geladen werden und im elektrischen Feld der Elektrophorese zur Anode wandern. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dann nach ihren Molekulargewichten (Shapiro, Viñuela und Maizel 1967). Die mit Phenol aus den M12-Phagen oder aus den Essigsäureniederschlägen isolierten radioaktiv markierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Dazu wurden zu einer vorbereiteten Proteinlösung (s.S.116) 0,005 ml Bromphenolblaulösung (0,02% in Wasser) als Farbstoffmarker gegeben. Ein Gelröhrchen wurde in den mit Elektrophoresepuffer gefüllten Elektrophoresetopf eingesetzt und die Proteinlösung wurde vorsichtig auf das Gel geschichtet. Die Elektrophorese wurde mit 5mA/Gel bei Raumtemperatur durchgeführt und abgebrochen, sobald nach ca. 12 Stunden die Farbstoffmarkierung das untere Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde mit Preßluft aus dem Gelröhrchen entfernt und mit Hilfe eines Gelschneiders in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten, die einzeln in Szintillationsröhrchen überführt wurden. Jedes Röhrchen wurde mit 1 ml Lösung I gefüllt. Nach Schütteln der Röhrchen über Nacht haben sich die Scheibchen aufgelöst. Jedes Röhrchen wurde dann mit 15 ml Kinard's Reagenz gefüllt. Die Radioaktivität wurde in einem Packard 'Tricarb' Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

8) Isolation der RNA mit Phenol aus den Phagen:
(nach Schuster, Schramm und Zillig, 1956)

Ein Aliquot aus einer Phagenstammlösung mit ca. 2×10^{14} Phagen wurde in 0,5 ml STE-Puffer, der 1% SDS enthielt, suspendiert. Diese Suspension wurde nach Zugabe von 0,5 ml Phenol, das mit dem gleichen Puffer gesättigt war, für 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phenol- und die wäßrige Phase wurden durch fünfminütige Zentrifugation voneinander getrennt und die letztere wurde mit einer ste-

rilen Pipette vorsichtig abgezogen. Sie wurde noch 2 x mit Phenol extrahiert. Dann wurde die RNA in der wäßrigen Phase mit dem 2,5fachen Volumen absoluten Äthanol gefällt. Das Präzipitat wurde über Nacht bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt und anderntags bei 5000 Upm und -10°C für 30 Minuten in einer Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert. Das Äthanol wurde abpipettiert und der Niederschlag an der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Die RNA wurde nach Lösen in 1 ml Puffer II ohne Mercaptoäthanol noch 2x mit Äthanol umgefällt zum Entfernen von Phenol- und SDS-Resten und an der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Danach wurde sie in dem jeweils gewünschten Puffer gelöst.

Wenn die RNA aus ^{32}P -markierten Phagen isoliert wurde, wurden diese mit unmarkierten Phagen gemischt, so daß insgesamt ca. 2×10^{14} Phagen zur Phenolextraktion eingesetzt wurden.

9) Isolation der RNA mit Phenol aus einem Essigsäureniederschlag:

Ein gewaschener Essigsäureniederschlag (s. ET, S.115), aus dem die RNA zu isolieren war, wurde in 0,5 ml STE-Puffer, der 1% SDS enthielt, gelöst. Es wurden 0,5 ml Phenol hinzugefügt und die RNA extrahiert und 2x umgefällt wie es für die RNA-Extraktion aus den Phagen beschrieben wurde.

10) Die Bestimmung des biologischen Phagentiters im Plaque-test (modifiziert nach Adams, 1959):

0,1 ml Aliquots aus Verdünnungen von Phagenlösungen in Verdünnungspuffer wurden mit ungewaschenen Indikatorbakterien aus einer Übernachtskultur auf einer Petrischale gemischt. Die Mischungen wurden mit je 5 ml flüssigem, 45°C warmen

CW-Agar auf den Petrischalen zu dünnen Schichten ausgegossen (ausplattiert), die unterhalb von 45°C erstarrten. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Plaques gezählt.

11) Bestimmung der Infektiosität in gelösten Essigsäureniederschlägen mit dem Infektiositätstest:

Eine Übernachtskultur des E.coli-Stammes AB301 in M3-Medium wurde für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert ($3.100\times g$). Die Zellen wurden mit frischem Medium gewaschen und im ursprünglichen Volumen frischen M3-Mediums resuspendiert. 0,5 ml der gewaschenen Bakterien wurden für 10 Minuten in ein 37°C -Wasserbad gestellt und dann infiziert mit 0,005 ml aus Verdünnungen der gelösten Essigsäureniederschläge in Puffer II. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37°C wurden die infizierten Bakterien direkt auf eine Petrischale pipettiert und unter Zusatz von 5 ml 45°C warmen flüssigem CW-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Plaques anderntags gezählt.

12) Herstellen der Sphäroplasten:

E.coli-Bakterien des Stammes AB301 aus einer Übernachtskultur in M3-Medium wurden 1:100 in 1l P-Medium hinein verdünnt und bei 37°C stark belüftet. Bei einem Zelltitert von 3×10^8 Bakterien/ml wurde die Kultur in sterile MSE-Becher gegossen. Die Zellen wurden in der MSE-Zentrifuge bei 4.500 Upm für 5 Minuten abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 25 ml Lysemischung aufgenommen. Nach fünfminütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde die Lyse durch Zugabe von 100 ml Sphäroplastenmedium, denen 1 ml 10%ige

Magnesiumsulfat-Lösung in sterilem Wasser zugesetzt worden war, gestoppt. Die Zellen wurden bei 4.000 Upm für 7 Minuten abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Sphäroplasten in 20 ml Sphäroplastenmedium aufgenommen.

13) Bestimmung der infektiösen RNA im Sphäroplastentest:

1 ml frisch hergestellter Sphäroplasten wurde mit 0,01 ml steriler 10%iger Magnesiumsulfat-Lösung und mit 0,02 ml RNase-freier DNase (1 mg/ml in sterilem Wasser) bei 37° C inkubiert. Nach 20 Minuten wurde der DNase-Verdau mit 4 ml Sphäroplastenmedium gestoppt. Die Sphäroplasten wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Je 0,5 ml der Sphäroplasten wurden zu 0,1 ml der auf Infektiosität zu testenden sterilen RNA-Lösung (in 0,003 m EDTA) pipetiert. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 3 ml 45° C warmer NTS-Agar dazugegeben. Die Mischung wurde sofort auf Bodenagar-Platten ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Anderntags wurden die Plaques gezählt.

14) Abscheren der F-Pili von den E.coli-Bakterien AB301 mit dem Ultrathorax

Eine Übernachtskultur von Bakterien des Stammes AB301 in M3-Medium (2×10^9 Zellen/ml) wurde auf 0° C abgekühlt. Die F-Pili wurden von den Bakterien mit dem Ultrathorax für eine Minute im Eisbad abgeschoren. Die geschorenen Zellen wurden bei 0° C für 10 Minuten bei 5.000 Upm in einer Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert und im ursprünglichen Volumen mit frischem, eiskalten M3-Medium resuspendiert. Dann wurde der Schervorgang wiederholt und die geschorenen Zellen wurden nach Abzentrifugieren im Ausgangsvolumen frischen, eiskalten M3-Mediums aufgenommen. Sie

wurden sofort für die Teste eingesetzt.

15) Analyse der gelösten Essigsäureniederschläge im Saccharosegradienten:

I. Herstellung der Gradienten:

Die Gradienten wurden aus zwei Lösungen von 15 bzw. 30% RNase-freier Mann-Saccharose in Puffer II hergestellt. Mit Hilfe eines Gradientenmischgefäßes wurde aus je 6 ml der beiden Lösungen ein linearer Gradient von 12 ml in einem SW 41-Gradientenröhrchen geschichtet. (Vorheriges Auskochen mit Wasser ließ die Röhrchen manchmal während der Zentrifugation kollabieren. Deshalb wurden sie vorher nur dreimal mit sterilem warmen Wasser ausgeschüttelt.)

0,2 ml der gelösten Essigsäureniederschläge wurden mit einer Pipette vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen. Nach der Übersichtung wurden je drei Röhrchen in den Rotor (Spinco SW 41) eingesetzt und 20 Stunden bei 35.000 Upm und einer Temperatur von 0° C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugenlauf wurden die Röhrchen mit einem Niveaugefäß verbunden. Nach Einstechen einer Kanüle durch den Boden der Röhrchen wurde der Gradient durch Verstellen des Niveaugefäßes in Fraktionen von je 4 Tropfen in eisgekühlte Verdünnungsröhrchen abgenommen.

II. Analyse der Gradientenfraktionen auf:

a. Infektiosität

Direkt nach Abnahme des Gradienten wurden je 0,005 ml Aliquots pro Fraktion entnommen und in 0,05 ml eiskalten Puffer II verdünnt. Die Infektiosität wurde im Infektiositätstest bestimmt.

b. RNA:

Bei den Gradienten, in denen die RNA nicht radioaktiv markiert war, wurde der RNA-Gehalt eines Aliquots der Gradientenfraction durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. War dagegen die RNA mit ^{32}P -markiert, so wurde ein Aliquot der Fractionen nach Zugabe von 0,1 mg Rinderalbumin (als Fällungshilfe) mit dem gleichen Volumen 10%iger TCA in der Kälte gefällt. Nach einer Stunde Stehen bei 0°C wurde das Präzipitat über Millipore-Filter filtriert. Die Filter wurden dreimal mit 5%iger eiskalter TCA und dreimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und dann getrocknet. Die getrockneten Filter wurden in Glasröhrchen gegeben, die mit je 10 ml Szintillationsreagenz gefüllt waren. Die ^{32}P -Radioaktivität wurde in einem 'Tricarb'-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

c. ^{35}S -Radioaktivität des A- und Coatproteins:

Die ^{35}S -Radioaktivität der markierten Proteine der Gradientenfractionen wurde durch 5%ige TCA-Fällung bestimmt wie es für die ^{32}P -Radioaktivität beschrieben wurde (s. unter b.).

d. ^3H -Histidin-Radioaktivität des A-Proteins:

1972 beschrieben Krahn u. Mitarb., daß bei der ^3H -Histidinmarkierung des A-Proteins des Phagen R17 auch ein Teil der Markierung in der RNA vorliegt.

Deshalb wurde untersucht, wieviel Prozent der in den M12-Phagen vorhandenen ^3H -Histidinradioaktivität in der RNA vorkommt. Die mit kalter TCA gefällte phenolisierte RNA enthielt je nach Phagenpräparation 10 - 30% der gesamten ^3H -Histidinmarkierung der Phagen.

Die von der RNA stammende Radioaktivität konnte durch heiße

TCA-Behandlung (Mans u. Novelli, 1960) oder durch pankreatischen RNase-Verdau der RNA vor der kalten TCA-Fällung entfernt werden.

Zur Messung des A-Proteinprofils im Saccharosegradienten anhand der ^3H -Histidinradioaktivität wurden daher Aliquots der Gradientenfraktionen vor der kalten TCA-Fällung mit je 0,01 mg RNase A (aus Rinderpankreas) für 15 Minuten bei 37°C zur Entfernung markierter RNA verdaut. Nach dem RNase-Verdau wurde die ^3H -Histidin-Radioaktivität des A-Proteins durch Fällung mit kalter 5%iger TCA bestimmt (s. unter b.).

e. Proteingebundene, radioaktiv markierte ^{32}P -RNA mit dem Nirenberg-Filtertest (nach Nirenberg und Leder, 1964):

Zur Bestimmung der ^{32}P -Radioaktivität der proteingebundenen RNA wurden direkt nach dem Infektiositätstest Aliquots der Gradientenfraktionen mit je 3 ml eiskalten Nirenberg-Puffer gemischt, und die Mischung wurde sofort über Cellulosenitrat-Filter (HA Millipore-Filter, Porengröße: $0,45\mu$, Durchmesser: 25 mm), die mit 5 ml eiskaltem Nirenbergpuffer gewaschen worden waren, filtriert. Die Filter wurden 3x mit 5 ml eiskaltem Nirenberg-Puffer gewaschen, um freie RNA zu entfernen und dann getrocknet. Die getrockneten Filter wurden in Glasröhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die ^{32}P -Radioaktivität wurde im 'Tricarb'-Flüssigkeits-szintillationszähler gemessen.

16) Analyse der mit ^{35}S radioaktiv markierten Proteine, die im Saccharosegradienten unter dem Infektiositätsgipfel bandieren, mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese:

Hierzu wurden Aliquots der Fraktionen des Infektiositäts- und Proteingipfels aus einem Saccharosegradienten vereinigt

und mit einem gleichen Volumen 10%iger eiskalter TCA gefällt nach Zugabe von 0,05 mg Rinderalbumin als Fällungshilfe. Nach einstündigem Stehen bei 0° C wurde das Präzipitat bei 5.000 Upm und 0° C in einer Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert. Es wurde dann zuerst mit 5 ml eines eiskalten 1:1-Gemisches aus Äthanol und Äther, und anschließend mit 5 ml eiskaltem Äther gewaschen. Der Äther wurde abpipettiert und der gewaschene Niederschlag wurde durch Absaugen von Ätherresten mit der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wurde in 0,25 ml STE-Puffer, der 1% SDS enthielt, gelöst. Mit Phenol wurden die radioaktiv markierten Proteine isoliert und mit 2 Volumina Aceton-0,1 m Essigsäure gefällt und weiter für die Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet wie es unter 5) beschrieben wurde.

- 17) Bestimmung der proteingebundenen, mit ^{32}P -markierten RNA in den gelösten Essigsäureniederschlägen mit Hilfe des Nirenberg-Filtertestes:

Aliquots von Lösungen der Essigsäureniederschläge in Puffer II wurden mit 3 ml eiskaltem Nirenberg-Puffer gemischt. Der Test wurde in gleicher Weise fortgeführt wie unter 13) e. beschrieben.

- 18) Die Isolierung von Coatprotein aus den Phagen mit 66%iger Essigsäure (modifiziert nach Sugiyama, Hebert und Hartman, 1967):

$2 - 5 \times 10^{14}$ Phagen wurden in 0,5 ml SSC-Puffer suspendiert und für 30 Minuten in Eis gestellt. Danach wurde die Phagensuspension zu 1 ml eiskaltem Eisessig pipettiert. Nach fünfminütigem Stehen im Eis wurde der dabei ausgefallene Essigsäureniederschlag für 30 Minuten bei 5.000 Upm und 0° C in einer Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert.

Der Überstand, der das Coatprotein enthielt, wurde abpipettiert und in einen Dialyseschlauch überführt. (Der Dialyseschlauch war 1x mit steriler 0,01 m EDTA-Lösung und anschließend 3x mit sterilem Wasser ausgekocht worden.)

Das Coatprotein wurde über Nacht bei 0° C im Kühlraum gegen 3 x 1 Liter 10⁻³ m Essigsäure ausdialysiert. Die Menge des ausdialysierten Coatproteins wurde mit dem Lowry-Test (Lowry, Rosebrough, Farr und Randall, 1951) ermittelt. Als Eichlösung diente dabei eine Rinderalbuminlösung (1 mg Protein/ml) in sterilem Wasser.

19) Herstellung der Acrylamid-Methylenbisacrylamidgele:
(modifiziert nach Weber und Osborn, 1969):

15 ml zweifach konzentrierten Dialysepuffers ohne Mercapto-äthanol wurden mit 13,5 ml Lösung 1 gemischt und entlüftet. Dann wurden 1,5 ml frisch hergestellter Lösung 2 und 0,045 ml TEMED hinzugefügt. Die fertige Gelmasse wurde sofort in die Gelröhrchen, die am unteren Ende mit Parafilm verschlossen waren, einpipettiert und vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Das Einfüllen der Gelmasse in die Gelröhrchen mußte sehr schnell geschehen, da die Gelmasse innerhalb weniger Minuten erstarrte. Der Geldurchmesser betrug 0,6 cm, die Länge 6,5 - 7 cm.

20) Molekulargewichtsbestimmung des A- und Coatproteins mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

a) Herstellung der A-/Coatproteinlösung:

A- und Coatprotein wurden mit Phenol aus einem Essigsäureniederschlag isoliert wie im ET auf S.117 beschrieben, jedoch ohne Zusatz von Rinderalbumin. Die Phenolproteine wurden weiter für die Gelelektrophorese aufbereitet (s.ET, S. 116)

und schließlich in 0,05 ml Dialysepuffer gelöst.

b) Herstellung der Eichproteinlösungen:

Folgende Proteine wurden als Eichproteine mit bekanntem Molekulargewicht verwendet:

Pyruvatkinase: 57.000, Ovalbumin: 43.000, Pepsin: 35.000, Trypsin: 23.300 und Lysozym: 14.300 D.

Jedes Protein wurde in einer Konzentration von 1 mg Protein/ml in Dialysepuffer gelöst.

c) Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung:

Als Gele wurden die Acrylamid-Methylenbisacrylamidgele verwendet. Auf zwei Gele wurde jeweils eine Mischung der Eichproteine aufgetragen. Die Lösungen setzten sich zusammen aus jeweils 0,02 ml von jeder Eichproteinlösung, 0,06 ml Dialysepuffer und 0,04 ml Glycerin (Gel 1 u. 2).

Auf zwei weitere Gele (3 u. 4) wurde eine Mischung aus Eichproteinen und aus der nach a) hergestellten A-/Coatproteinlösung geschichtet. Diese Mischungen enthielten jeweils 0,02 ml der Eichproteinlösungen, 0,05 ml der A-/Coatproteinlösung, 0,01 ml Dialysepuffer und 0,04 ml Glycerin. Als Farbstoffmarker wurden zu jeder Lösung 0,005 ml Bromphenolblau gegeben. Als Elektrophoresepuffer wurde Dialysepuffer benutzt.

Die Elektrophorese wurde für alle vier Gele parallel in einem Elektrophoresetopf mit 8mA/Gel bei Raumtemperatur durchgeführt und abgebrochen, sobald nach etwa 1,5 Stunden der Bromphenolblaumarker das untere Gelende erreicht hatte.

Die Gele wurden mit Preßluft aus den Gelröhrchen entfernt. Der Weg, den der Farbstoffmarker im Gel zurückgelegt hatte, wurde in cm gemessen, ebenso die Gellänge. Dann wurden die Gele zum Anfärben der Proteinbanden für 30 Minuten bei Raum-

temperatur in die Coomassie-Brilliantblau-Lösung gelegt. Anschließend wurden die Gele in Entfärberlösung überführt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Das Entfärben der Gele bei Raumtemperatur bis zum Sichtbarwerden der angefärbten Proteinbanden dauerte 2 - 3 Tage. Die Länge der Gele nach dem Entfärben und ebenso die Wegstrecken, die die einzelnen Proteinbanden in die Gele hineingewandert waren, wurden in cm gemessen.

Danach wurden die Gele in 7,5%igem Eisessig aufbewahrt.

d) Auswertung der Experimente und Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeiten der Proteine:

Die Trennung von Proteinen in der Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergenz SDS ist abhängig vom Molekulargewicht der Proteine (Shapiro, Viñuela und Maizel, 1967), wobei gilt:

$$\log M_{\text{Protein}} \sim \text{elektr. Beweglichkeit}_{\text{Protein}} \quad (\text{I})$$

Werden die elektrophoretischen Beweglichkeiten von Proteinen gegen die Zehnerlogarithmen ihrer bekannten Molekulargewichte aufgetragen, so resultiert eine Gerade. Mit deren Hilfe kann das noch unbekannte Molekulargewicht von Proteinen durch Interpolation gefunden werden.

Als Proteine mit bekannten Molekulargewichten wurden die Eichproteine benutzt.

Durch Vermessen der 5 Banden in Gel 1 und 2 wurden die Beweglichkeiten der Eichproteine nach Gleichung II errechnet:

$$\text{elektr. Beweglichkeit} = \frac{W_{\text{Protein}} \times L_{\text{vor Färben}}}{L_{\text{nach Entfärben}} \times W_{\text{Farbstoff}}} \quad (\text{II})$$

W_{Protein} = vom Protein zurückgelegte Weglänge im Gel

$W_{\text{Farbstoff}}$ = vom Farbstoff zurückgelegte Weglänge im Gel.

$L_{\text{vor Färben}}$ = Gellänge vor dem Färben

$L_{\text{nach Entfärben}}$ = Gellänge nach dem Entfärben

Der Quotient $L_{\text{vor Färben}}/L_{\text{nach Entfärben}}$ ist ein empirischer Korrekturfaktor, der eingeführt werden muß, da die Gele beim Färben und Entfärben durch Quellen ihre Länge verändern. Ebenso wurden die elektrophoretischen Beweglichkeiten der Proteine in Gel 3 und 4 errechnet. Die dabei zusätzlich aufgetretenen Beweglichkeiten wurden dem A- und Coatprotein zugeordnet durch Vergleich mit den Beweglichkeiten der Eichproteine in den Gelen 1 und 2.

Zusammenfassung

1) Literaturergebnisse führten zu der Hypothese, daß die RNA-Phagen der f2-Gruppe einen RNA-A-Proteinkomplex enthalten.

In dieser Arbeit wird ein solcher Komplex aus hochgereinigten M12-Phagen isoliert und seine Eigenschaften werden beschrieben.

Das kalkulierte Molekülverhältnis zwischen RNA und A-Protein im Komplex ist 1:1.

Die Dissoziation des Komplexes in hochmolaren Salz- oder Harnstofflösungen spricht für eine ionische Bindung zwischen RNA und A-Protein, an der Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind.

Der Komplex zeigt eine bis dahin nur ganzen Phagen zugeschriebene Eigenschaft, nämlich intakte E.coli-Zellen via F-Pili infizieren und in ihnen infektiöse Nachkommenphagen erzeugen zu können. Diese Infektiosität geht verloren bei der Dissoziation des Komplexes in RNA und A-Protein.

Nach der quantitativen Auswertung der experimentellen Befunde enthält nur ein geringer Teil (ca. 10%) der Phagen einen RNA-A-Proteinkomplex. Dieser Tatbestand wird diskutiert.

2) Es werden Untersuchungen zur Bestimmung der Zahl der A-Proteinmoleküle in M12-Phagen beschrieben. Dabei wird gezeigt, daß entgegen der allgemeinen Literaturauffassung nicht von einer konstanten Zahl von einem A-Proteinmolekül/Phage in gereinigten Phagenlösungen auszugehen ist.

In den untersuchten M12-Phagenpräparationen variiert die Zahl der A-Proteinmoleküle zwischen 1,2 - 0,2/Phage. Als eine Ursache hierfür wird ein unterschiedlicher Einbau von A-Protein in die Phagen bei ihrer Reifung diskutiert. Ein

zweiter Grund ist der Verlust von A-Protein bei der CsCl-Gradientenreinigung der Phagen.

Anhand der Ergebnisse wird kalkuliert, daß ungereinigte M12-Phagen in Rohlysaten ca. 1 - 2 Moleküle A-Protein pro Phage enthalten.

Wegen des Verlustes von A-Protein bei der Reinigung im CsCl-Gradienten können gereinigte Phagenlösungen weniger als 1 Molekül A-Protein pro Phage besitzen. Das bedeutet, daß ein Teil der Phagen kein A-Protein enthält. Die Bedeutung dieses Befundes für die biologischen Eigenschaften von RNA-Phagenlösungen wird diskutiert.

Das Molekulargewicht des A-Proteins von M12 wird zu 39.000 D bestimmt. Es liegt damit im gleichen Bereich (35.-41.000 D) wie die Molekulargewichte des A-Proteins der anderen RNA-Phagen der f2-Gruppe.

3) In einer RNA-Phagenlösung ist stets nur ein geringer Teil der Phagen infektiös. Es wird untersucht, a) was die infektiösen von den nicht infektiösen Phagen unterscheidet, und b) warum der Titer der infektiösen Phagen so gering ist.

Nach den Ergebnissen des 1. Teils wird die Hypothese aufgestellt, daß nur die infektiösen Phagen einen RNA-A-Proteinkomplex enthalten. Diese Hypothese wird durch die Analyseergebnisse an drei verschiedenen infektiösen Phagenlösungen gestützt. In diesen ist der Prozentsatz der im Komplex gebundenen RNA stets so groß wie der Prozentsatz der infektiösen Phagen.

Nach diesen Resultaten sind Phagen nur dann infektiös, wenn ihre RNA an A-Protein gebunden vorliegt. In einer Phagenlösung ist der Prozentsatz infektiöser Phagen so gering (5 - 10%), weil nur wenige Phagen einen RNA-A-Proteinkomplex enthalten.

In den übrigen nicht infektiösen Phagen liegen die RNA und das A-Protein in ungebundener Form nebeneinander vor. Die biologischen Funktionen des RNA-A-Proteinkomplexes in den infektiösen Phagen werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

- Adams, M.H., Bacteriophages Interscience New York 1959
- Argetsinger, J.E., G.N. Gussin (1966), J. Mol. Biol. 21, 421
- Argetsinger-Steitz, J.E. (1968 a), J. Mol. Biol. 33, 923
- Argetsinger-Steitz, J.E. (1968 b), J. Mol. Biol. 33, 937
- Bernardi, A., P.F. Spahr (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3033
- Brinton, C.C. Jr. (1965), Trans. N.Y. Acad. Sci. 27, 1003
- Capecchi, M.R., G.N. Gussin (1965), Science 149, 417
- Cramer, J.H., R.L. Sinsheimer (1971), J. Mol. Biolog. 62, 189
- Davis, J.E., J.H. Strauss, R.L. Sinsheimer (1961), Science 134, 1427
- Davis, B.J. (1964), Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404
- Delius, H. (1966), Thesis, Universität München
- Edgell, M.H., W. Ginoza (1965), Virology 27, 23
- Eggen, K., D. Nathans (1969), J. Mol. Biol. 39, 293
- Enger, M.D., P. Kaesberg (1965), J. Mol. Biol. 13, 260
- Favre, R., E. Boy de la Tour, N. Segré, E. Kellenberger (1965),
J. Ultrastr. Res. 13, 318
- Fraenkel-Conrat, H. (1957), Virology 4, 1
- Francke, B., P.H. Hofschneider, unveröffentlichte Ergebnisse
- Gesteland, R.F. (1966), J. Mol. Biol. 16, 67
- Ginoza, W., C.J. Hoelle, K.B. Vessey, C. Carmack (1964), Nature 203,
606
- Godson, G.N., R.L. Sinsheimer (1967), J. Mol. Biol. 23, 495
- Gussin, G.N. (1966), J. Mol. Biol. 21, 435
- Guthrie, G.D., R.L. Sinsheimer (1960), J. Mol. Biol. 2, 297
- Heisenberg, M., J. Blessing (1965), Z. Naturforschg. 20b, 859
- Heisenberg, M. (1966), J. Mol. Biol. 17, 136
- Heisenberg, M. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 131
- Herrmann, R. (1970), Thesis, Universität Tübingen
- Hofschneider, P.H. (1960), Z. Naturforschg. 15b, 441
- Hofschneider, P.H. (1963), Z. Naturforschg. 18b, 203
- Hohn, T. (1967), Eur. J. Biochem. 2, 152
- Horiuchi, K., H.F. Lodish, N.D. Zinder (1966), Virology 28, 438

- Hung, P.P., L.R. Overby (1969), *Biochemistry* 8, 820
- Kaerner, H.C. (1970), *J. Mol. Biol.* 53, 515
- Kinard, F.E. (1957), *Rev. Sci. Instrum.* 28, 293
- Kozak, M., D. Nathans (1971), *Nature, N.B.* 234, 209
- Krahn, P.M., R.J. O'Callaghan, W. Paranchych (1972), *Virology* 47, 628
- Lodish, H.F., K. Horiuchi, N.D. Zinder (1965), *Virology* 27, 139
- Lodish, H.F. (1968 a), *Nature* 220, 345
- Lodish, H.F. (1968 b), *J. Mol. Biol.* 32, 681
- Lodish, H.F. (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 127
- Loeb, T., N.D. Zinder (1961), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47, 238
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265
- Mans, R.J., G.D. Novelli (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 540
- Nathans, D., M.P. Oeschger, K. Eggen, Y. Shimura (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56, 1844
- Nathans, D., M.P. Oeschger, S.K. Polmar, K. Eggen (1969), *J. Mol. Biol.* 39, 279
- Nirenberg, M.W., P. Leder (1964), *Science* 145, 1399
- Novotny, C., J. Carnahan, C.C. Jr. Brinton (1969 a), *J. Bacteriol.* 98, 1294
- Novotny, C., E. Raizen, W.S. Knight, C.C. Jr. Brinton (1969 b), *J. Bacteriol.* 98, 1307
- Ornstein, L. (1964), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321
- Osborn, M., A.M. Weiner, K. Weber (1970), *Eur. J. Biochem.* 17, 63
- Paranchych, W., P.M. Krahn, R.D. Bradley (1970), *Virology* 41, 465
- Paranchych, W., S.K. Ainsworth, A.J. Dick, P.M. Krahn (1971), *Virology* 45, 615
- Richelson, E., D. Nathans (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 842
- Roberts, J.W., J.E. Argetsinger Steitz (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58, 1416
- Sekiguchi, M.A. Taketo, Y. Takagi (1960), *Biochem. Biophys. Acta* 45, 199

- Schuster, H., G. Schramm, W. Zillig (1956), Z. Naturforschg. 11b, 339
- Shapiro, A.L., E. Vinuela, J.V. Jr. Maizel (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815
- Silverman, P.M., R.C. Valentine (1969) J. Gen. Virol. 4, 111
- Sugiyama, T., R.R. Hebert, K.A. Hartman (1967), J. Mol. Biol. 25, 455
- Sugiyama, T., D. Nakada (1967), Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1744
- Sugiyama, T., D. Nakada (1968), J. Mol. Biol. 31, 431
- Tanford, C. (1968), Advan. Protein Chem. 23, 121
- Tooze, J., K. Weber (1967), J. Mol. Biol. 28, 311
- Turri, M., G.A. Maccacaro, R. Dettori (1964), Giorn. Microbiol. 12, 153
- Valentine, R.C., P.M. Silverman, K.A. Ippen, H. Mobach (1969), Advan. Microbiol. Physiol. 3, 1
- Vandekerckhove, J., F. Nolf, M. Van Montagu (1973), Nature, N.B. 241, 102
- Vasquez, C., N. Granboulan, R.M. Franklin (1966), J. Bacteriol. 92, 1779
- Verbraeken, E., W. Fiers (1972), FEBS Letters 28, 89
- Vinuela, E., I.D. Algranati, S. Ochoa (1967), Eur. J. Biochem. 1, 3
- Vinuela, E., I.D. Algranati, G. Feix, D. Garwes, C. Weissmann, S. Ochoa (1968), Biochem. Biophys. Acta, 155, 558
- Wahl, R.J., J. Huppert, L. Emerique-Blum (1960) Compt. Rend. Acad. Sci. 250, 4227
- Weber, K. (1967), Biochemistry 6, 3144
- Weber, K., M. Osborn (1969), J. Biol. Chem. 244, 4406
- Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne, G. Treiber (1970), Virology 40, 734
- Zinder, N.D., L.B. Lyons (1968), Science 159, 84

LEBENS LAUF

Name:	Barbara Leipold, geb. Rimmelspacher, geboren am 19. 8. 1943 in Dresden Eltern: Rudolf Rimmelspacher und Gerda, geb. Pfeiffer
Ausbildung und Abschlüsse:	1950 - 1954: Besuch der Volksschulen in Bad Ems und Koblenz 1954 - 1960: Realschule Koblenz, abgeschlossen mit Mittlerer Reifeprüfung, März 1960 1960 - 1963: Besondere Oberstufenklassen des Staatl. Neusprachl. Gymnasiums in Koblenz, Abschlußprüfung (begrenzte Hochschulreife) März 1963 1963: Frauenlobschule Mainz, Ergänzungsprüfung für die uneingeschränkte Hoch- schulreife, Oktober 1963 1963 - 1965: Studium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Fachrichtungen Biologie, Chemie 1965 - 1970: Ludwig-Maximilians-Universität München, Fachrichtung Chemie Diplom-Hauptprüfung für Chemiker im März 1970 1970 - 1975: Anfertigung der Diplomarbeit und der vorgelegten Doktorarbeit.

